

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 12 月 29 日 (29.12.2004)

PCT

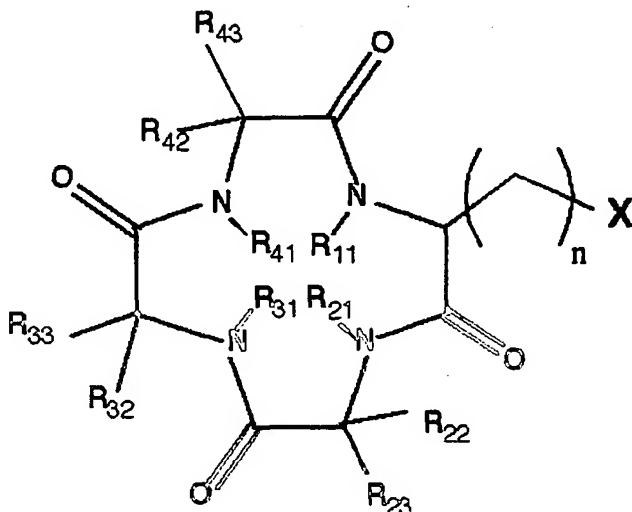
(10) 国際公開番号
WO 2004/113366 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C07K 5/12, A61P 35/00, 35/04, C12N 9/99, A61P 37/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/008924
- (22) 国際出願日: 2004 年 6 月 18 日 (18.06.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2003-177298 2003 年 6 月 20 日 (20.06.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 吉田 稔 (YOSHIDA, Minoru) [JP/JP]; 〒3340059 埼玉県川口市安行 6 5 5 - 2 1 Saitama (JP). 西野 憲和 (NISHINO, Norikazu) [JP/JP]; 〒8080104 福岡県北九州市若松区畠田 1 - 6 - 6 Fukuoka (JP).
- (74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒3000847 茨城県土浦市卸町 1 - 1 - 1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書

/続葉有/

(54) Title: HISTONE DEACETYLASE INHIBITOR AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称: ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤およびその製造方法



(1)

(57) Abstract: HDAC inhibitor of the general formula (1) exhibits strong inhibitory activity against various subtype HDAC's. The compound is useful as a medicinal agent for the treatment or prevention of HDAC 1, 4 and 6-related diseases. There is further provided a process for producing the compound which is capable of readily synthesizing various types of compounds and is promising in the contribution to the development of HDAC inhibitor having novel properties, etc.

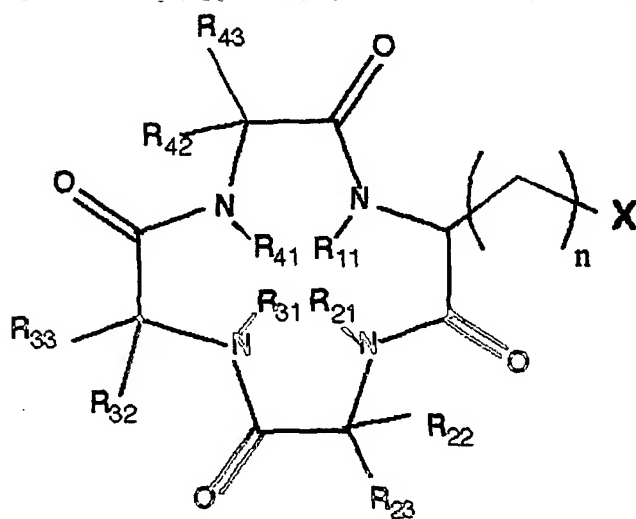
/続葉有/



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

一般式(1)で示されるHDAC阻害剤は、様々なサブタイプのHDACに対して強い阻害活性を示す。本発明の化合物は、HDAC 1, 4および6に關与している疾患の治療または予防のための薬剤として有用となる。また、本発明の化合物の製造方法は、種々のタイプの化合物を簡便に合成することができ、新たな性質を持ったHDAC阻害剤などの開発に寄与することが期待される。



(1)

- 1 -

明細書

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤およびその製造方法

5 技術分野

本発明はヒストン脱アセチル化酵素 (Histone deacetylase:HDAC) 阻害剤およびその製造方法に関する。

背景技術

- 10 真核生物のクロマチン構造と遺伝子の発現は、ヒストンアセチル化酵素 (HAT) によるヒストンのアセチル化と、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) による脱アセチル化によって調節されている。HDACの阻害剤ががん細胞の分化や、アポトーシスを誘導することが以前から知られ、制がん剤としての応用が期待されている (非特許文献 1～3)。実際、米国では動物実験で制がん剤としての有効性を示す
- 15 いくつかのHDAC阻害剤 (非特許文献 4 及び 5) の臨床研究が開始されている。

- HDAC特異的阻害剤としてはトリコスタチン A (TSA) が有名である (非特許文献 6)。実際、TSAは白血病細胞、神経細胞、乳癌細胞などの分化を誘導することが知られている (非特許文献 7～14)。さらにHDAC阻害剤とは異なる機構で遺伝子発現を活性化する薬物との併用によって、その分化誘導作用やアポトーシス誘導作用は相乗的に増大することも知られている。例えば、核内受容体であるレチノイン酸受容体を活性化し、分化に関する遺伝子発現を引き起こすレチノイン酸とHDAC阻害剤との併用でがん細胞の分化が促進される (非特許文献 9、13、15 及び 16)。また、多くのがん細胞ではがん抑制遺伝子の発現が低下しているが、その原因として知られるDNAのメチル化を阻害する5-アザデオキシシチジンと
- 20 25 の併用によってがん抑制遺伝子の発現の回復とがん細胞のアポトーシスが促進される (非特許文献 17～21)。

- 2 -

HDAC阻害剤は、制がん剤としてのみならず、がん予防薬としても期待されている。TSAやSAHA等は、動物の化学発がんモデルにおいて乳癌の発生を顕著に抑制した。また、バルプロ酸を用いた研究から、HDAC阻害剤は転移を抑制することも示されている（非特許文献14）。

- 5 HDAC阻害剤は制がん剤以外にも、例えば自己免疫疾患、ポリグルタミン病等の神経変性疾患（非特許文献22及び23）、皮膚病、感染症（非特許文献24）などの治療・改善薬、さらには遺伝子治療におけるベクター導入の効率化（非特許文献25）、導入遺伝子の発現亢進（非特許文献26）など様々な応用も試みられている。また、HDAC阻害剤は血管新生阻害作用を有すると考えられている
- 10 （非特許文献27及び28）。

- HDACには10種類以上のサブタイプが存在するが、近年、特定のHDACサブタイプとがんとの密接な関係がわかってきた。例えば、発がんの抑制に極めて重要な役割を果たすがん抑制遺伝子p53の機能発現にp53自身のアセチル化が重要であり（非特許文献29）、その機能阻害にHDAC1やHDAC2が関わること（非特許文献30）、前
- 15 骨髄球性白血病（APL）の発症に関わる蛋白質PML-RARやPLZF-RAR、リンパ腫の発症に関わるBcl-6等のがん遺伝子が、核内コリプレッサーを介してHDAC4などをリクルートし、正常な分化に必要な遺伝子群の発現を抑制することで発がんに至ることなどが示されている（非特許文献31～34）。その一方で、組織特異的に発現するHDACサブタイプの中には、正常な組織の発生や分化に重要な役割を果たす
- 20 ものが存在することが知られている（非特許文献35及び36）。

- HDAC6は核外輸送によって核-細胞質間をシャトルし、通常は細胞質に局在する酵素である（非特許文献37）。HDAC6は精巢などで発現が高く、正常な組織の分化に関わると推定される。また、HDAC6は微小管の脱アセチル化に関与し、微小管の安定性を制御することが知られている（非特許文献38）。さらに、HDAC6は微
- 25 小管に結合する脱アセチル化酵素で、細胞の運動性に関与する（非特許文献39）。よってHDAC6の阻害剤は転移抑制剤となる可能性がある。TSAは各HDACサブ

- 3 -

タイプをほぼ同等に強く阻害するが、環状テトラペプチド構造を有し、活性基としてエポキシケトンを持つトラポキシンはHDAC6を阻害することができない（非特許文献40）。酵素の立体構造の情報から、環状テトラペプチドはあまり保存されていない酵素の活性中心の外側と相互作用するため、環状テトラペプチド部分の構造によってHDAC6との結合性が低いと推定される。このことは環状テトラペプチド部分の改変によって様々なHDACに選択的な阻害剤を創製できる可能性があることを示している。

TSAはヒドロキサム酸基がHDAC活性ポケット内で亜鉛に配位することで阻害活性を示す（非特許文献41）。ヒドロキサム酸を有するHDAC阻害剤としては、Oxamf latin（非特許文献42）、CHAP（非特許文献40及び43）なども知られている。しかし、TSAは血中で不安定である上にヒドロキサム酸のキレート作用が強力なために他の必須な金属イオンとキレートを形成してしまうなどの理由で、ヒドロキサム酸を有するHDAC阻害剤はこれまでのところ抗がん剤として実際の使用には至っていない。これに対し、最近になってFK228のジスルフィド結合の還元により生じるチオール基が、HDAC活性ポケット内の亜鉛と配位する活性基となり、HDACを阻害し得ることが示された。このようにFK228は、細胞内の還元力で還元されて活性化するプロドラッグである（非特許文献44）。

また、天然界から環状テトラペプチド構造を有し、活性基としてエポキシケトンを持つHDAC阻害剤が複数単離されている。このような知見から、酵素認識に対する環状テトラペプチド構造の有用性が示唆されているが（前掲Yoshidaら、1995）、これまでの阻害剤は安定性などの種々の点で医薬品として十分に満足できるレベルには達したものはない。そこでそれらの問題点を解決した薬剤の開発が強く望まれている。

尚、本出願の発明に関連する先行技術文献情報を以下に示す。

25 〔非特許文献1〕 Marks, P. A., Richon, V. M., and Rifkind, R. A. (2000) Histone deacetylase inhibitors: Inducers of differentiation or apoptosis of

- 4 -

transformed cells. J. Natl. Cancer Inst. 92, 1210-1216

[非特許文献2] Yoshida, M., Horinouchi, S., and Beppu, T. (1995) Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function. Bioessays 17, 423-430

- 5 [非特許文献3] Bernhard, D., Loffler, M., Hartmann, B. L., Yoshida, M., Kofler, R., and Csordas, A. (1999) Interaction between dexamethasone and butyrate in apoptosis induction: non-additive in thymocytes and synergistic in a T cell-derived leukemia cell line. Cell Death Diff. 6, 609-617

- [非特許文献4] Nakajima, H., Kim, Y. B., Terano, H., Yoshida, M., and Horinouchi, S. (1998) FR901228, a potent antitumor antibiotic, is a novel histone deacetylase inhibitor. Exp. Cell Res. 241, 126-133
- 10

- [非特許文献5] Saito, A., Yamashita, T., Mariko, Y., Nosaka, Y., Tsuchiya, K., Ando, T., Suzuki, T., Tsuruo, T., and Nakanishi, O. (1999) A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 4592-4597
- 15

[非特許文献6] Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., and Beppu, T. (1990) Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. J. Biol. Chem. 265, 17174-17179

- 20 [非特許文献7] Yoshida, M., Nomura, S., and Beppu, T. (1987) Effects of trichostatins on differentiation of murine erythroleukemia cells. Cancer Res. 47: 3688-3691

- [非特許文献8] Hoshikawa, Y., Kijima, M., Yoshida, M., and Beppu, T. (1991) Expression of differentiation-related markers in teratocarcinoma cells via histone hyperacetylation by trichostatin A. Agric. Biol. Chem. 55: 1491-1495
- 25

- 5 -

- [非特許文献 9] Minucci, S., Horn, V., Bhattacharyya, N., Russanova, V., Ogryzko, V. V., Gabriele, L., Howard, B. H., and Ozato, K. (1997) A histone deacetylase inhibitor potentiates retinoid receptor action in embryonal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 11295-11300
- 5 [非特許文献 10] Inokoshi, J., Katagiri, M., Arima, S., Tanaka, H., Hayashi, M., Kim, Y. B., Furumai, R., Yoshida, M., Horinouchi, S., and Omura, S. (1999) Neuronal differentiation of Neuro 2a cells by inhibitors of cell progression, trichostatin A and butyrolactone I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256, 372-376
- 10 [非特許文献 11] Wang, J., Sauntharajah, Y., Redner, R. L., and Liu, J. M. (1999) Inhibitors of histone deacetylase relieve ETO-mediated repression and induce differentiation of AML1-ETO leukemia cells. *Cancer Res.* 59: 2766-2769
- [非特許文献 12] Munster, P. N., Troso-Sandoval, T., Rosen, N., Rifkind, R., Marks, P. A., and Richon, V. M. (2001) The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces differentiation of human breast cancer cells. *Cancer Res.* 61: 8492-8497
- 15 [非特許文献 13] Ferrara, F. F., Fazi, F., Bianchini, A., Padula, F., Gelmetti, V., Minucci, S., Mancini, M., Pelicci, P. G., Lo Coco, F., and Nervi, C. (2001) Histone deacetylase-targeted treatment restores retinoic acid signaling and differentiation in acute myeloid leukemia. *Cancer Res.* 61: 2-7
- 20 [非特許文献 14] Gottlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Kramer, O. H., Schimpf, A., Giavara, S., Sleeman, J. P., Lo Coco, F., Nervi, C., Pelicci, P. G., and Heinzl, T. (2001) Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.* 20: 69

69-6978

- [非特許文献15] Coffey, D. C., Kutko, M. C., Glick, R. D., Butler, L. M., Heller, G., Rifkind, R. A., Marks, P. A., Richon, V. M., and La Quaglia, M. P. (2001) The histone deacetylase inhibitor, CBHA, inhibits growth of human neuroblastoma xenografts in vivo, alone and synergistically with all-trans retinoic acid. *Cancer Res.* 61: 3591-3594
- [非特許文献16] Petti, M. C., Fazi, F., Gentile, M., Diverio, D., De Fabritiis, P., De Propriis, M. S., Fiorini, R., Spiriti, M. A., Padula, F., Pelicci, P. G., Nervi, C., and Lo Coco, F. (2002) Complete remission through blast cell differentiation in PLZF/RAR α -positive acute promyelocytic leukemia: in vitro and in vivo studies. *Blood* 100: 1065-1067
- [非特許文献17] Nan, X., Ng, H. H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N., and Bird, A. (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393: 386-389
- [非特許文献18] Cameron, E. E., Bachman, K. E., Myohanen, S., Herman, J. G., and Baylin, S. B. (1999) Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nature Genet.* 21: 103-107
- [非特許文献19] Li, Q. L., Ito, K., Sakakura, C., Fukamachi, H., Inoue, K., Chi, X. Z., Lee, K. Y., Nomura, S., Lee, C. W., Han, S. B., Kim, H. M., Kim, W. J., Yamamoto, H., Yamashita, N., Yano, T., Ikeda, T., Itohara, S., Inazawa, J., Abe, T., Hagiwara, A., Yamagishi, H., Ooe, A., Kaneda, A., Sugimura, T., Ushijima, T., Bae, S. C., and Ito, Y. (2002) Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* 109: 113-124

- 7 -

- [非特許文献 2 0] Boivin, A. J., Momparler, L. F., Hurtubise, A., and Momparler, R. L. (2002) Antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine and phenylbutyrate on human lung carcinoma cells. *Anticancer Drugs* 13: 869-874
- 5 [非特許文献 2 1] Primeau, M., Gagnon, J., and Momparler, R. L. (2003) Synergistic antineoplastic action of DNA methylation inhibitor 5-AZA-2'-deoxycytidine and histone deacetylase inhibitor depsipeptide on human breast carcinoma cells. *Int J Cancer* 103: 177-184
- [非特許文献 2 2] Darkin-Rattray SJ, Gurnett AM, Myers RW, Dulski PM, Crumley TM, Allocco JJ, Cannova C, Meinke PT, Colletti SL, Bednarek MA, Singh SB, Goetz MA, Dombrowski AW, Polishook JD, Schmatz DM. (1996) a novel antiprotozoal agent that inhibits parasite histone deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13143-13147
- 10 [非特許文献 2 3] Steffan JS, Bodai L, Pallos J, Poelman M, McCampbell A, Apostol BL, Kazantsev A, Schmidt E, Zhu YZ, Greenwald M, Kurokawa R, Housman DE, Jackson GR, Marsh JL, Thompson LM. (2001) Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature*. 413 739-43
- 15 [非特許文献 2 4] McCampbell A, Taye AA, Whitty L, Penney E, Steffan JS, Fischbeck KH. (2001) Histone deacetylase inhibitors reduce polyglutamine toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* : 98 15179-15184
- [非特許文献 2 5] Dion LD, Goldsmith KT, Tang DC, Engler JA, Yoshida M, Garver RI Jr. (1997) Amplification of recombinant adenoviral transgene products occurs by inhibition of histone deacetylase. *Virology* 231, 201-209
- 25 [非特許文献 2 6] Chen WY, Bailey EC, McCune SL, Dong JY, Townes TM. (1997) Reactivation of silenced, virally transduced genes by inhibitors of hi

- 8 -

stone deacetylase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 5798-5803

[非特許文献 27] Kim, M. S., Kwon, H. J., Lee, Y. M., Baek, J. H., Jang, J. E., Lee, S. W., Moon, E. J., Kim, H. S., Lee, S. K., Chung, H. Y., Kim, C. W., and Kim, K. W. (2001) Histone deacetylases induce angiogenesis
5 by negative regulation of tumor suppressor genes. Nature Med. 7, 437-443

[非特許文献 28] Kwon, H. J., Kim, M. S., Kim, M. J., Nakajima, H., and Kim, K. W. (2002) Histone deacetylase inhibitor FK228 inhibits tumor angiogenesis. Int. J. Cancer 97, 290-296

[非特許文献 29] Ito, A., Lai, C. H., Zhao, X., Saito, S., Hamilton, M.
10 H., Appella, E., and Yao, T. P. (2001) p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. EMBO J. 20, 1331-1340

[非特許文献 30] Juan, L. J., Shia, W. J., Chen, M. H., Yang, W. M., Seto, E., Lin, Y. S., and Wu, C. W. (2000) Histone Deacetylases Specifically
15 Down-regulate p53-dependent Gene Activation. J. Biol. Chem. 275, 20436-20443

[非特許文献 31] Dhordain P., Albagli, O., Lin, R. J., Ansieau, S., Quief, S., Leutz, A., Kerckaert, J. P., Evans, R. M., and Leprince, D. (1997) Corepressor SMRT binds the BTB/POZ repressing domain of the LAZ3/BCL6 on
20 coprotein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 10762-10767

[非特許文献 32] Grignani, F., De, M. S., Nervi, C., Tomassoni, L., Gelmetti, V., Cioce, M., Fanelli, M., Ruthardt, M., Ferrara, F. F., Zamir, I., Seiser, C., Grignani, F., Lazar, M. A., Minucci, S., and Pelicci, P. G. (1998) Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone
25 deacetylase in promyelocytic leukaemia. Nature 391, 815-818

[非特許文献 33] He, L. Z., Guidez, F., Tribioli, C., Peruzzi, D., Rutha

- 9 -

- rdt, M., Zelent, A., and Pandolfi, P. P. (1998) Distinct interactions of PML-RARalpha and PLZF-RARalpha with co-repressors determine differential responses to RA in APL. *Nature Genet.* 18, 126-135
- [非特許文献 3 4] Lin, R. J., Nagy, L., Inoue, S., Shao, W., Miller, W. J., and Evans, R. M. (1998) Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature* 391, 811-814
- [非特許文献 3 5] McKinsey, T. A., Zhang, C. L., Lu, J., and Olson, E. N. (2000) Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature* 408, 106-111
- 10 [非特許文献 3 6] Verdel, A., and Khochbin, S. (1999) Identification of a new family of higher eukaryotic histone deacetylases. Coordinate expression of differentiation-dependent chromatin modifiers. *J. Biol. Chem.* 274, 2440-2445
- [非特許文献 3 7] Verdel, A., Curtet, S., Brocard, M.-P., Rousseaux, S., Lemercier, C., Yoshida, M., and Khochbin, S. (2000) Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. *Curr. Biol.* 10, 747-749
- 15 [非特許文献 3 8] Matsuyama, A., Shimazu, T., Sumida, Y., Saito, A., Yoshimatsu, Y., Seigneurin-Berny, D., Osada, H., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., Horinouchi, S., and Yoshida, M. (2002) In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J.* 21, 6820-6831
- [非特許文献 3 9] Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.-F., and Yao, T.-P. (2002) HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417, 455-458
- 25 [非特許文献 4 0] Furumai, R., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., Yo

- 10 -

shida, M., and Horinouchi, S. (2001) Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 87-92

[非特許文献 4 1] Finnin, M. S., Donigian, J. R., Cohen, A., Richon, V.

5 M., Rifkind, R. A., Marks, P. A., Breslow, R., and Pavletich, N. P. (1999) Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. Nature 401: 188-193

[非特許文献 4 2] Kim, Y. B., Lee, K.-H., Sugita, K., Yoshida, M., and Horinouchi, S. (1999) Oxamflatin is a novel antitumor compound that inhibits
10 s mammalian histone deacetylase. Oncogene 18: 2461-2470

[非特許文献 4 3] Komatsu, Y., Tomizaki, K.-y., Tsukamoto, M., Kato, T., Nishino, N., Sato, S., Yamori, T., Tsuruo, T., Furumai, R., Yoshida, M., Horinouchi, S., and Hayashi, H. (2001) Cyclic Hydroxamic-acid-containing Peptide 31, a potent synthetic histone deacetylase inhibitor with antitumor
15 or activity. Cancer Res. 61: 4459-4466

[非特許文献 4 4] Furumai, R., Matsuyama, A., Kobashi, N., Lee, K.-H., Nishiyama, M., Nakajima, H., Tanaka, A., Komatsu, Y., Nishino, N., Yoshida, M., and Horinouchi, S. (2002) FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. Cancer Res. 62, 4916-4921

20

発明の開示

本願発明者らは、環状テトラペプチド構造を有する新規なHDAC阻害剤およびその製造方法を提供することを目的とする。

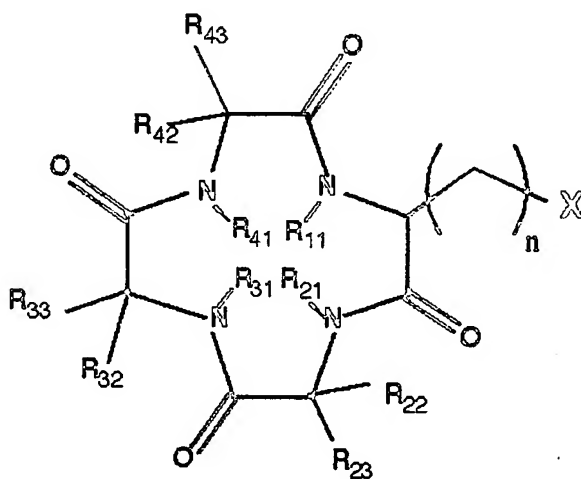
上記課題に鑑み、本願発明者らは、ヒストン脱アセチル化酵素の活性中心部に
25 位置する亜鉛に配位することのできる、様々な官能基を有する環状テトラペプチド構造を有する化合物を合成し、そのHDAC阻害活性を解析した。その結果、カル

- 11 -

ボニル基を有する化合物および、フルオロ基を有する化合物、レトロヒドロキサム酸基を有する化合物は*in vitro*、*in vivo*どちらの系においても強いHDAC阻害活性を示すことが確認された。さらに、細胞レベルでのこれらの化合物の活性を解析したところ、HDAC阻害剤として知られているトリコスタチンA (TSA) と同様の強い活性が観察された。また、これらの化合物はヒストンの脱アセチル化を阻害するだけでなく、チューブリンの脱アセチル化についても阻害することが観察された。すなわち、これらの化合物は細胞内で強い活性を示すことから、HDAC阻害剤として有用であることが示された。

即ち、本発明は、HDAC阻害剤およびその製造方法に関し、以下の〔1〕～〔10 1〕を提供するものである。

〔1〕 以下の一般式（1）で示される化合物。



(1)

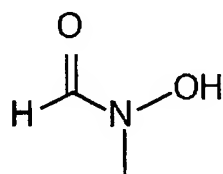
式中、 R_{11} 、 R_{21} 、 R_{31} 、 R_{41} はそれぞれ独立して水素またはメチル基を示す。 R_{22} 、

R_{23} 、 R_{32} 、 R_{33} 、 R_{42} 、 R_{43} はそれぞれ独立して水素、炭素数1～6の直鎖アルキル基、非芳香族環状アルキル基もしくは置換基を有することもある芳香環が結合した炭素数1～6の直鎖アルキル基、非芳香族環状アルキル基、または非芳香族環状アルキル基もしくは置換基を有することもある芳香環が結合した非芳香族環状アルキル基のいずれかを示す。また、 R_{21} と R_{22} 、 R_{22} と R_{23} 、

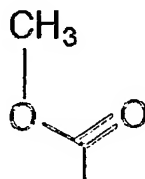
- 12 -

R_{31} と R_{32} , R_{32} と R_{33} , R_{41} と R_{42} , R_{42} と R_{43} は、それぞれ結合を持たず非環状構造を示すか、または鎖長炭素数1~5の直鎖アルキレン基、炭素数1~6の分岐鎖を有する鎖長炭素数1~5の直鎖アルキレン基、もしくは、炭素数1~6の環構造を備えた鎖長炭素数1~5の直鎖アルキレン基を介して結合した環構造を示す。nはHDAC阻害活性を有する範囲で選択することができる。Xは、ヒストン脱アセチル化酵素の活性中心部に位置する亜鉛に配位することのできる構造を持つ任意の構造体を示す。

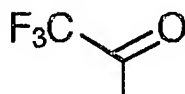
〔2〕 X部位の構造が以下の構造式で示す置換基のいずれかである、〔1〕に記載の化合物。



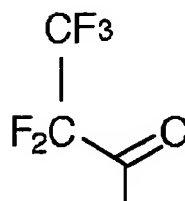
N(OH)COH



COOMe

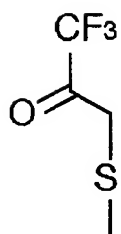


Tfk



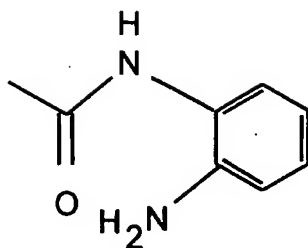
Pfek

- 13 -



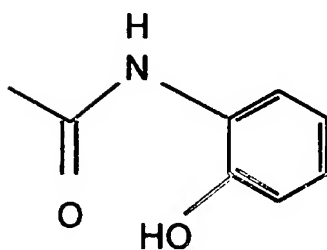
Mtfk

5



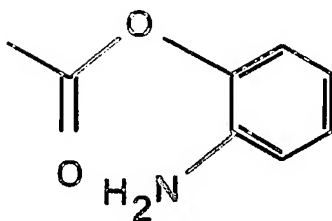
OPD

10



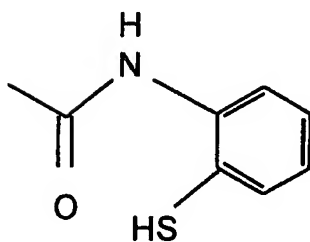
OAPOH

15



OAPNH

20



OATP

25

〔3〕 〔1〕記載の化合物を有効成分として含有する、ヒストン脱アセチル化

- 14 -

酵素阻害剤。

〔４〕 〔１〕記載の化合物を有効成分として含有する、チューブリン脱アセチル化酵素阻害剤。

〔５〕 〔１〕記載の化合物を有効成分として含有する、アポトーシス誘導剤。

５ 〔６〕 〔１〕記載の化合物を有効成分として含有する、分化誘導剤。

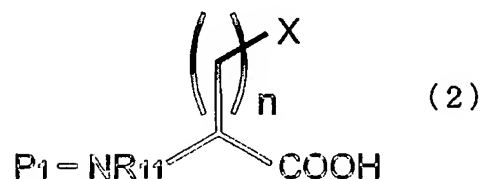
〔７〕 〔１〕記載の化合物を有効成分として含有する、血管新生阻害剤。

〔８〕 〔１〕記載の化合物を有効成分として含有する、がん転移抑制剤。

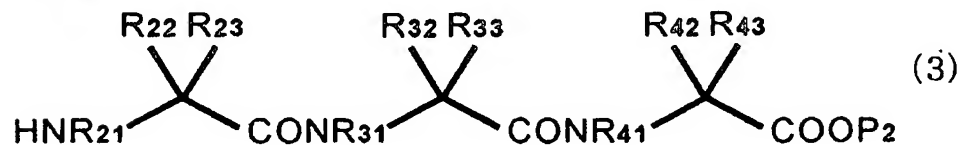
〔９〕 〔１〕記載の化合物を有効成分として含有する、ヒストン脱アセチル化酵素 １、４または ６ に起因した疾患の治療または予防のための薬剤。

１０ 〔１０〕 ヒストン脱アセチル化酵素 １、４または ６ に起因した疾患が、がん、自己免疫疾患、神経変性疾患、皮膚病、または感染症である、〔９〕記載の治療または予防のための薬剤。

〔１１〕 一般式（２）



１５ （式中、Xは請求項 １、２で定義したものと同様であり、P₁ はアミノ基の保護基を表す）で示される化合物を、一般式（３）



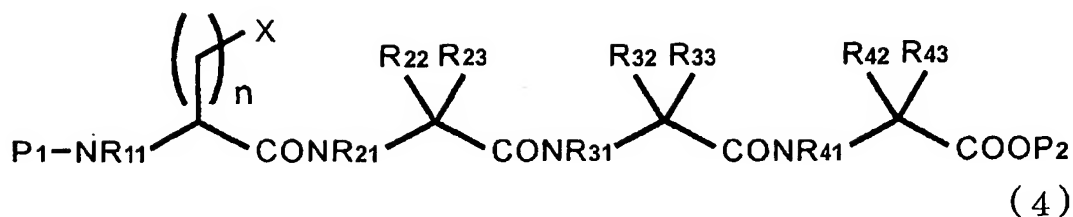
（式中、R₁₁, R₂₁, R₂₂, R₂₃, R₃₁, R₃₂, R₃₃, R₄₁, R₄₂, 及び R₄₃は、一般式

（１）で定義したものと同様であり、P₂ はカルボキシル基の保護基を表

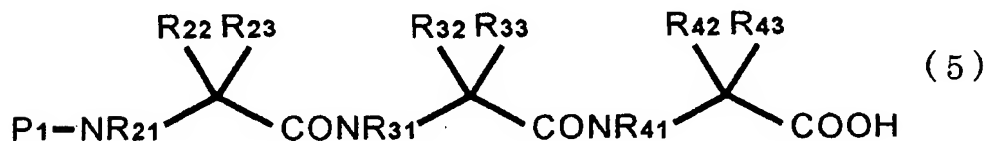
２０ す）で示される化合物とペプチド結合剤の存在下で反応させ、一般式

（４）

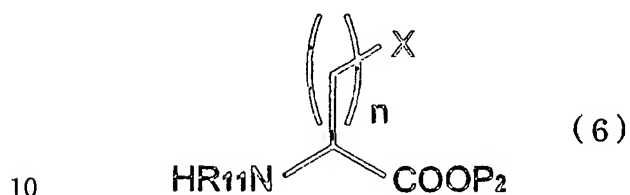
- 15 -



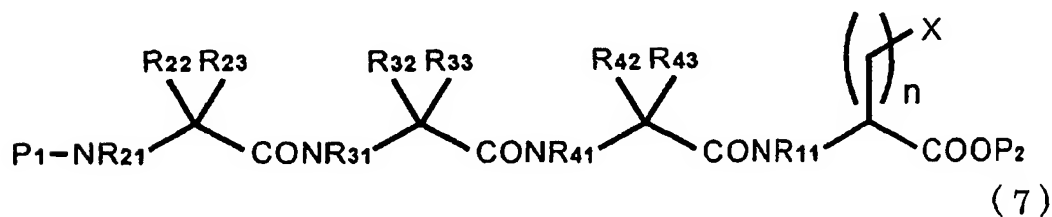
(式中、 n , R_{11} , R_{21} , R_{22} , R_{23} , R_{31} , R_{32} , R_{33} , R_{41} , R_{42} , R_{43} , P_1 , P_2 , 及び X は、前記で定義したものと同様である)で示される化合物を得、次いで前記一般式(4)で示される化合物を、触媒的水素化、酸処理、もしくは加水分解により、 P_1 及び P_2 を除去した後に、ペプチド結合剤の存在下で環化反応させるか、または一般式(5)



(式中、 R_{21} , R_{22} , R_{23} , R_{31} , R_{32} , R_{33} , R_{41} , R_{42} , R_{43} , 及び P_1 は、前記で定義したと同様である)で示される化合物を、一般式(6)



(式中、 n , R_{11} , P_2 , 及び X は、前記で定義したものと同様である)で示される化合物とペプチド結合剤存在下で反応させ、一般式(7)



(式中、 n , R_{11} , R_{21} , R_{22} , R_{23} , R_{31} , R_{32} , R_{33} , R_{41} , R_{42} , R_{43} , P_1 , P_2 , 及び X は、前記で定義したと同様である)で示される化合物を得、次いで一般式

- 16 -

(7) で示される化合物を、触媒的水素化、酸処理、フルオリドアニオン処理、もしくは加水分解により P_1 及び P_2 を除去した後に、ペプチド結合剤の存在下で環化反応するか、または一般式 (1) の環状テトラペプチドのXがカルボキシル基またはスルフィドリル基であるものを、それぞれ無水トリフルオロ酢酸や無水ペンタフルオロプロパン酸または 1,1,1-トリフルオロ-3-ブromoアセトンと反応させて別種の置換基Xとなすことを含む、
5 [1] 記載の化合物の製造方法。

以下、本発明の実施の形態について図面に基づき詳細に説明する。

本発明の化合物は、上記の一般式 (1) で示すことができる。このような化合物はHDAC阻害剤として使用できる。
10

上記式 (1) 中、 R_{11} , R_{21} , R_{31} , R_{41} はそれぞれ独立して水素またはメチル基を示す。 R_{22} , R_{23} , R_{32} , R_{33} , R_{42} , R_{43} はそれぞれ独立して水素、炭素数1~6の直鎖アルキル基、非芳香族環状アルキル基もしくは置換基を有することもある芳香環が結合した炭素数1~6の直鎖アルキル基、非芳香族環状アルキル基、または非芳香族環状アルキル基もしくは置換基を有することもある芳香環が結合した非芳香族環状アルキル基のいずれかを示す。また、 R_{21} と R_{22} , R_{22} と R_{23} , R_{31} と R_{32} , R_{32} と R_{33} , R_{41} と R_{42} , R_{42} と R_{43} は、それぞれ結合を持たず非環状構造を示すか、または鎖長炭素数1~5の直鎖アルキレン基、炭素数1~6の分岐鎖を有する鎖長炭素数1~5の直鎖アルキレン基、もしくは、炭素数1~6の環構造を備えた鎖長炭素数1~5の直鎖アルキレン基を介して結合した環構造を形成してもよい。この環状テトラペプチド構造部分はHDACのポケットをふさぐキャップとして機能し得ると考えられるため、このキャップ構造として機能し得る範囲で、上記炭素数1~6の直鎖アルキル基、芳香族環状アルキル基、これらの置換基となり得る芳香族を任意に選択することができる。
15

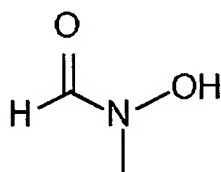
また、式 (1) 中Xは、ヒストン脱アセチル化酵素の活性中心部に位置する亜鉛に配位することのできる構造を持つ任意の構造体を示す。Xに反応性の高い官能基
25

- 17 -

を置換した場合には、生体内で不安定となる。そのため、Xが反応性の高い官能基である場合には、ドラッグデリバリーシステムなどのように所望の部位まで安定に輸送し得る手段と組み合わせることが好ましい。また、HDAC阻害活性を有する官能基の安定性を高めるために、生体内で代謝され、生体に有害でない置換基を用いることが好ましい。このような置換基としては、側鎖にケトン型のZn配位子を有する置換基が好ましく、置換基自身で何らかの効能を示すものであってもよく、また、単に保護基としての機能を備えているものであってもよい。

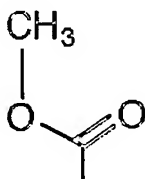
置換基Xの好ましい構造の例を次に示す。

10

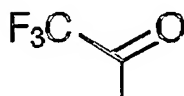


N(OH)COH

15

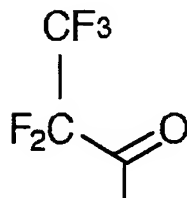


COOMe



Tfk

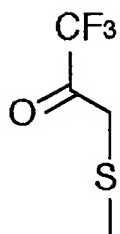
20



Pfek

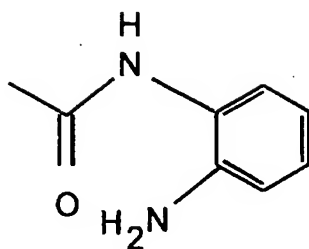
25

- 18 -



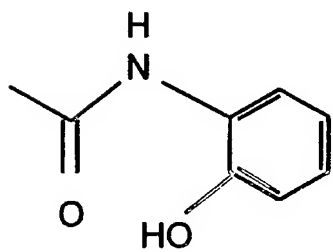
Mtfk

5



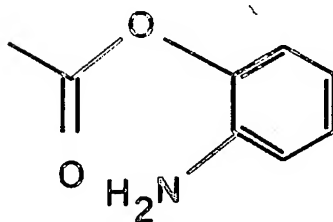
OPD

10



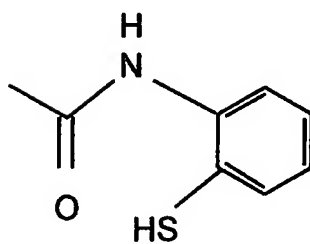
OAPOH

15



OAPNH

20



OATP

25

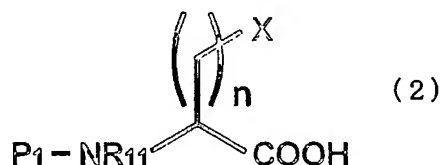
また、本発明において式（１）中、 n はHDAC阻害活性を有する範囲で選択することができ、例えば、 n は好ましくは４～６、最も好ましくは５である。この環状ペプチド構造から伸び、炭素数 n からなる炭素鎖は、HDACの活性ポケット部分に侵入し、この炭素鎖先端の様々な官能基をHDACのポケット内の亜鉛分子に接触

5 させHDACを阻害する機能を有すると考えられる。

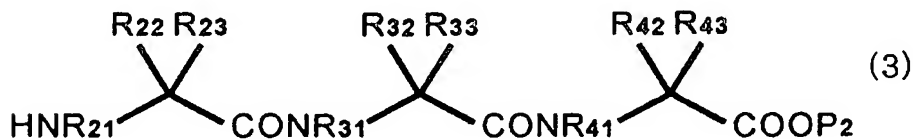
また、以下に本発明の化合物の製造方法について説明する。本実施形態の化合物は、一般式(2)もしくは(6)で示された化合物を原料として以下の通り製造することができる。なお、 n , R_{11} , R_{21} , R_{22} , R_{23} , R_{31} , R_{32} , R_{33} , R_{41} , R_{42} , R_{43} , P_1 , P_2 および X などの定義は上述の説明で述べた定義と同一であるので、ここではそ

10 の説明を省略する。

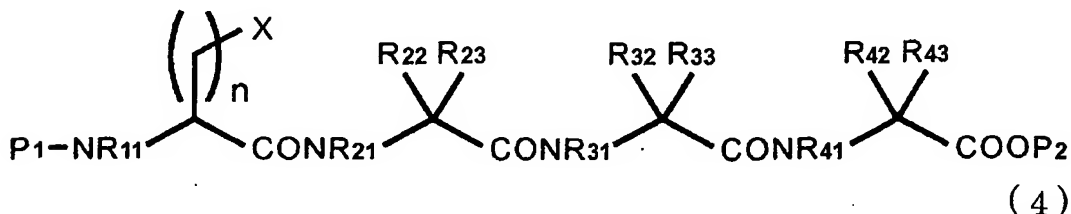
本発明における化合物の製造方法の第一の態様は、以下の一般式（２）で示された化合物を原料として製造する方法である。具体的には、一般式（２）



で示される化合物 (X)における置換基の特定の部位が以後の化学反応によって何らかの修飾および置換を受ける場合は、修飾および置換を受ける部位に保護基を結合させてもよい) と、一般式 (3)



で示される化合物をペプチド結合剤の存在下で反応させ、一般式(4)

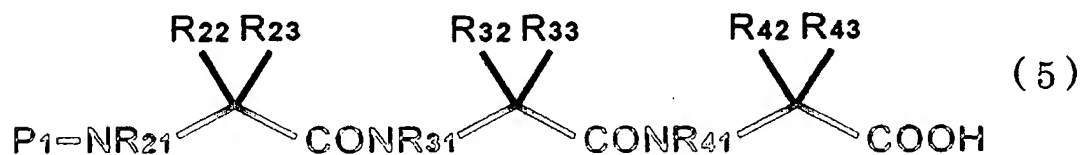


(4)

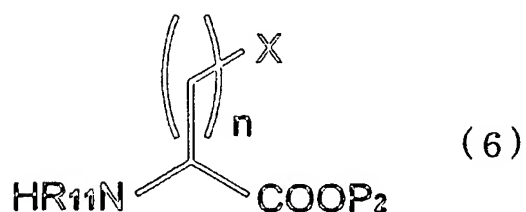
で示される化合物を得る。これら式中、Xは図2に記載の置換基、P₂ はアミノ基の保護基を表す。

次いで前記一般式（４）で示される化合物を、触媒的水素化、酸処理、フルオリドアニオン処理、もしくは加水分解により、 P_1 及び P_2 を除去した後に、ペプチド結合剤の存在下で環化反応させ、一般式（１）で示される化合物を得る。始めに一般式（２）のXの特定の部位において保護基を結合させた場合、最後の過程において、触媒的水素化、酸処理、フルオリドアニオン処理、もしくは加水分解により保護基を取り除く工程を含んでもよい。

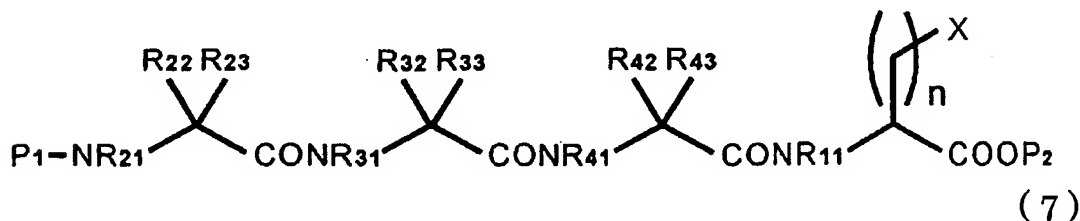
本発明の化合物の製造方法の第二の態様は、以下の一般式（６）で示された化
10 合物を原料として製造する方法である。具体的には、一般式（５）



で示される化合物を、一般式(6)



で示される化合物（Xにおける置換基の特定の部位が以後の化学反応によって何らかの修飾および置換を受ける場合は、修飾および置換を受ける部位に保護基を結合させてもよい）とペプチド結合剤存在下で反応させ、一般式（7）



で示される化合物を得る。次いで一般式(7)で示される化合物を、触媒的水素

- 21 -

- 化、酸処理、フルオリドアニオン処理、もしくは加水分解により P_1 及び P_2 を除去した後に、ペプチド結合剤の存在下で環化反応させて、一般式 (1) で示される化合物を得る。始めに一般式 (2) のXの特定の部位において保護基を結合させた場合、最後の過程において、触媒的水素化、酸処理、フルオリドアニオン処理、
- 5 もしくは加水分解により保護基を取り除く工程を含んでもよい。また、一般式 (1) の環状テトラペプチドのXがカルボキシル基またはスルフィドリル基であるものを、それぞれ無水トリフルオロ酢酸や無水ペンタフルオロプロパン酸または 1,1,1-トリフルオロ-3-ブromoアセトンと反応させて別種の置換基Xとなす一般式 (1) で示される化合物を得る。
- 10 HDACを阻害する化合物が、がん細胞、白血病細胞、および神経細胞などの分化を誘導すること、アポトーシスを誘導すること、また、がんの転移を抑制することが以前から知られている (Yoshida, M., Nomura, S., and Beppu, T. (1987) Effects of trichostatins on differentiation of murine erythroleukemia cells. *Cancer Res.* 47: 3688-3691; Hoshikawa, Y., Kijima, M., Yoshida, M., and
- 15 Beppu, T. (1991) Expression of differentiation-related markers in teratocarcinoma cells via histone hyperacetylation by trichostatin A. *Agric. Biol. Chem.* 55: 1491-1495; Minucci, S., Horn, V., Bhattacharyya, N., Russanova, V., Ogryzko, V. V., Gabriele, L., Howard, B. H., and Ozato, K. (1997) A histone deacetylase inhibitor potentiates retinoid receptor action in
- 20 embryonal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 11295-11300; Inokoshi, J., Katagiri, M., Arima, S., Tanaka, H., Hayashi, M., Kim, Y. B., Furumai, R., Yoshida, M., Horinouchi, S., and Omura, S. (1999). Neuronal differentiation of Neuro 2a cells by inhibitors of cell progression, trichostatin A and butyrolactone I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256, 3
- 25 72-376; Wang, J., Sauntharajah, Y., Redner, R. L., and Liu, J. M. (1999) Inhibitors of histone deacetylase relieve ETO-mediated repression and

- 22 -

induce differentiation of AML1-ETO leukemia cells. *Cancer Res.* 59: 2766-2769; Munster, P. N., Troso-Sandoval, T., Rosen, N., Rifkind, R., Marks, P. A., and Richon, V. M. (2001) The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces differentiation of human breast cancer cells. *Cancer Res.* 61: 8492-8497; Ferrara, F. F., Fazi, F., Bianchini, A., Padula, F., Gelmetti, V., Minucci, S., Mancini, M., Pelicci, P. G., Lo Coco, F., and Nervi, C. (2001) Histone deacetylase-targeted treatment restores retinoic acid signaling and differentiation in acute myeloid leukemia. *Cancer Res.* 61: 2-7; Gottlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Kramer, O. H., Schimpf, A., Giavara, S., Sleeman, J. P., Lo Coco, F., Nervi, C., Pelicci, P. G., and Heinzl, T. (2001) Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.* 20: 6969-6978)。よって、本発明の化合物は、アポトーシス誘導剤、分化誘導剤、およびがん転移抑制剤として利用できる。

また、HDACを阻害する化合物は、血管新生を阻害すると予想されている (Kim, M. S., Kwon, H. J., Lee, Y. M., Baek, J. H., Jang, J. E., Lee, S. W., Moon, E. J., Kim, H. S., Lee, S. K., Chung, H. Y., Kim, C. W., and Kim, K. W. (2001) Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nature Med.* 7, 437-443; Kwon, H. J., Kim, M. S., Kim, M. J., Nakajima, H., and Kim, K. W. (2002) Histone deacetylase inhibitor FK228 inhibits tumor angiogenesis. *Int. J. Cancer* 97, 290-296)。よって、本発明の化合物は、血管新生阻害剤としても利用できる。

また、本発明の化合物は、種々のHDACのうち、HDAC 1, 4または6に対して強い阻害活性を示す。そのため、本発明の化合物は、HDAC 1, 4または6に起因した疾患の治療または予防のための薬剤として有用になる。この疾患としては、がん以外にも、HDAC 1, 4または6が関与した自己免疫疾患、神経変性疾患、皮膚

- 23 -

病、感染症などを含めることができる。また、本発明の化合物は、上記疾患の治療または予防のための薬剤への応用だけでなく、遺伝子治療におけるベクター導入の効率化、導入遺伝子の発現亢進などのような遺伝子治療の補助剤あるいは促進剤として応用してもよい。

- 5 また、本発明の化合物はレチノイン酸やDNAメチル化阻害剤と併用することができる。本発明は、このような併用剤もまた提供するものである。

本発明の化合物を製剤化する場合には、必要に応じて充填剤、増量剤、結合剤、保湿剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤等の希釈剤あるいは賦形剤を用いることができる。また、この医薬製剤中に着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤等や他
10 の医薬品を医薬製剤中に含有させてもよい。この医薬製剤としては各種の形態が治療目的または予防目的に応じて選択でき、例えば、錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤、カプセル剤、注射剤、坐剤等が挙げられる。

錠剤、カプセル剤に混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸のような膨化剤、
15 ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖又はサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油又はチェリーのような香味剤が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。

20 また、注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80™、HCO-50と併用してもよい。

25 油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝

- 24 -

液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

- 患者への投与は、経口、非経口投与のいずれでも可能である。非経口投与の剤型としては、例えば、注射剤型、経鼻投与剤型、経肺投与剤型、経皮投与型などが挙げられる。注射剤型の例としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などにより全身または局所的に投与することができる。また、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、経皮的、または経口的に当業者に公知の方法により投与しうる。
- 10 本発明の化合物を非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重60kgとして）においては、通常、1日当たり約0.01から30mg、好ましくは約0.1から20mg、より好ましくは約0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合であると考えられる。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量、あ
- 15 るいは体表面積あたりに換算した量を投与することができる。
- また、本発明の化合物を経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば通常成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約100 μ gから20mgであると考えられる。
- なお、本明細書において引用されたすべての先行技術文献は、参照として本明
- 20 細書に組み入れられる。

図面の簡単な説明

- 図1は、一般式(1)の化合物を示した図である。
- 図2は、一般式(1)の化合物における置換基Xの代表的な例を示した図である。
- 25 図3は、天然のCyl-1, Cyl-2は立体コンフォメーションを示す図である。
- 図4は、細胞内でのチューブリン及びヒストンアセチル化レベルを、抗アセチ

- 25 -

ル化リジン抗体を用いたウェスタンにより測定した結果を示す写真である。図中R4, R5, R6は各々N(OH)COH(n=4), N(OH)COH(n=5), N(OH)COH(n=6)を示す。

図5は、O-phenylenediamine (OPD)、O-aminophenolのアミド (OAPOH)、O-aminophenolのエステル (OAPNH)、O-aminothiophenol (OATP) の構造式を示した図

5 である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により、さらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

- 10 本発明の各化合物の合成工程について以下に詳細に説明する。なお、ここでは2-amino-6-bromohexanoic acidを「Ab6」と、2-amino-6-acetylthiohexanoic acidを「Am6(Ac)」、2-amino-6-(3', 3', 3' -trifluoracetylthio)-hexanoic acidを「Am6(Tfacet)」、2,8-diaminooctanoic acidを「A2oc」、2-amino-7-dimethylphosphonylheptanoic acidを「Aph」、 α -aminosuberic acidを「Asu」、formyl基を「For」、homolysineを「Hly」、2-amino-8-oxo-9,9,9-trifluorononanoic acidを「Tfm」、O-methyltyrosineを「Tyr(Me)」、2-amino-8-oxo-9,9,10,10,10-pentafluorodecanoic acidを「Pfe」、pipecolic acidを「Pip」と略す。また、O-phenylenediamineを「OPD」、O-aminophenolのアミドを「OAPOH」、O-aminophenolのエステルを「OAPNH」、O-aminothiophenolを「OATP」と略す。

- 20 実施例1. cyclo(-L-Asu(OMe)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-)の合成

既存の方法で合成したcyclo(-L-Asu(OBzl)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (0.150 mol, 100 mg) を MeOH (1 ml) に溶解した。4 N HCl/ジオキサン (50 μ l) を加え、室温で 8 時間放置した。反応液を濃縮し、シリカゲルクロマトグラフィーで精製し、フォーム状の目的物を得た (column: Merck Kieselgel 60 Φ 1.5x15 cm, eluent: CHCl₃/MeOH, 99/1)。収量 65 mg (0.113 mmol, 76%)。

実施例2. cyclo(-L-Lys(For, OH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pip-) およびcyclo(-L-

- 26 -

Lys(For, OH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pip-) の合成

(1) Ac-DL-Ab6-OtBuの合成

Ac-DL-Ab6-OH (1.26 g, 50 mmol) をDCM (100 ml) に溶解し、濃硫酸 (1 ml) を加えた。氷冷下、イソブチレンガス (50 ml) を吹き込み、室温で 11日間放置
5 した。4% 炭酸水素ナトリウム水溶液 (80 ml) を加えた後、放置してイソブチレンガスを揮発させた。DCM溶液を10% クエン酸水溶液、4% 炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水でそれぞれ 3 回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、DCMを留去した。シリカゲルクロマトグラフィーで精製し、シロップ状の目的物を得た (column: Merck Kieselgel 60 Φ5.0x10 cm, eluent: CHCl₃/MeOH, 49/1)。TLC:
10 R_f, 0.8 (CHCl₃/MeOH, 49/1)。収量 9.25 g (30.1 mmol, 60%)。

(2) Ac-DL-Lys(OBzl)-OtBu の合成

Ac-DL-Ab6-OtBu (9.25 g, 30 mmol) をメタノール (120 ml) に溶解し、O-ベンジルヒドロキシルアミン塩酸塩 (9.58 g, 60 mmol) およびDIEA (20.9 ml, 120 mmol) を加え、80℃ で 4日間還流を行った。反応液を濃縮し、酢酸エチルで抽出
15 した。4% 炭酸水素ナトリウム水溶液、蒸留水で 1 回ずつ洗浄した後、炭酸ナトリウムで乾燥し、酢酸エチルを留去した。シリカゲルクロマトグラフィーによって精製し、シロップ状の目的物を得た (column: Merck Kieselgel 60 Φ5.0x22 cm, eluent: CHCl₃/MeOH, 49/1)。TLC: R_f, 0.3 (CHCl₃/MeOH, 49/1)。収量 5.13 g (14.6 mmol, 49%)。

20 (3) Ac-DL-Lys(For, OBzl)-OtBu の合成

氷冷下Ac-DL-Lys(OBzl)-OtBu (4.01 g, 11.5 mmol) にギ酸 (58 ml) および無水酢酸 (5.4 ml, 50 mmol) を加え、1 時間攪拌した。反応液を濃縮し、酢酸エチルで抽出した。3 回水洗後、硫酸マグネシウムで乾燥し、酢酸エチルを留去した。シリカゲルクロマトグラフィーで精製し、シロップ状の目的物を得た (column:
25 Merck Kieselgel 60 Φ3.4x20 cm, eluent: CHCl₃/MeOH, 99/1)。TLC: R_f, 0.45 (CHCl₃/MeOH, 49/1)。収量 3.27 g (8.53 mmol, 75%)。

- 27 -

(4) Ac-DL-Lys(For, OBzl)-OH の合成

Ac-DL-Lys(For, OBzl)-OtBu (3.27 g, 8.53 mmol) にTFA (9 ml) を加え、室温で 2 時間放置した。反応液を濃縮し、酢酸エチルで抽出した。3 回水洗し、硫酸マグネシウムで乾燥後、酢酸エチルを留去した。

5 (5) Boc-L-Lys(For, OBzl)-OH の合成

Ac-DL-Lys(For, OBzl)-OH (8.53 mmol) を蒸留水 (2 ml) に溶解し、2 N 水酸化ナトリウム水溶液を用いて溶液のpHを 7 に調整した。塩化コバルト6水和物 (7 mg) および *Aspergillus genus* アミノアシラーゼ (260 mg) を加え、40°C で一晩放置した。反応液を 5 ml まで濃縮し、ジオキサン (5 ml) を加えた。氷冷下
10 Boc₂O (1.86 g, 8.52 mmol) および Et₃N (1.79 ml, 12.8 mmol) を加え、6 時間攪拌した。ジオキサンを留去し、残渣を酢酸エチルで抽出した。10% クエン酸水溶液および水で各 3 回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、酢酸エチルを留去して油状の目的物を得た。収量 2.34 g (6.15 mmol, 100%)。

(6) Boc-L-Lys(For, OBzl)-OTmse の合成

15 Boc-L-Lys(For, OBzl)-OH (2.34 g, 6.15 mmol) および Tmse-OH (1.76 ml, 12.8 mmol) を DCM (3 ml) に溶解し、氷冷下 DMAP (15 mg, 0.62 mmol) および DCC (1.52 g, 7.38 mmol) を加え、10 時間攪拌した。反応液を濃縮し、残渣を酢酸エチルで抽出した。10% クエン酸水溶液、4% 炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水でそれぞれ 3 回ずつ洗浄し、硫酸マグネシウム乾燥後、酢酸エチルを留去し
20 た。シリカゲルクロマトグラフィーで精製し、油状の目的物を得た (column: Merck Kieselgel 60 Φ2.4x20 cm, eluent: AcOEt/hexane, 1/4)。TLC: R_f, 0.5 (CHCl₃/MeOH, 99/1)。収量 338 mg (0.7 mmol, 11%)。

(7) Boc-L-Ile-DL-Pip-OBzl の合成

Boc-L-Ile-OH · 1/2H₂O (2.88 g, 12 mmol)、HCl · H-DL-Pip-OBzl (2.55 g, 10
25 mmol) および HOBT · H₂O (2.30 g, 15 mmol) を DMF (10 ml) に溶解し、氷冷下 Et₃N (1.4 ml, 10 mmol) および DCC (3.10 g, 15 mmol) を加えた。一晩攪拌し、

- 28 -

不溶物を濾過し反応液を濃縮した。残渣を酢酸エチルで抽出し、10% クエン酸水溶液、4% 炭酸水素ナトリウム水溶液、および飽和食塩水でそれぞれ3回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、酢酸エチルを留去してフォーム状の目的物を得た。収量 3.79 g (9.1 mmol, 91%)。

5 (8) Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-OBzl の合成

Boc-L-Ile-DL-Pip-OBzl (2.64 g, 6.1 mmol) に氷冷下 TFA (4 ml) を加え、30 分間放置した。TFA を留去した後、Boc-D-Tyr(Me)-OH (2.16 g, 7.3 mmol) および HOBt · H₂O (1.40 g, 9.15 mmol) を加え、DMF (10 ml) に溶解した。氷冷下 HBTU (3.47 g, 9.15 mmol) および Et₃N (3.51 ml, 25 mmol) を加え、1 時間攪拌した。反応液を濃縮し、残渣を酢酸エチルで抽出した。10% クエン酸水溶液、4% 炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水でそれぞれ3回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、酢酸エチルを留去した。シリカゲルクロマトグラフィーで精製してフォーム状の目的物を得た (column: Merck Kieselgel 60 Φ5.0x12 cm, eluent: CHCl₃/MeOH, 99/1)。TLC: R_f, 0.75 (CHCl₃/MeOH, 9/1)。収量 2.45 g (4.02 mmol, 66%)。

15 (9) Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-OH の合成

Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-OBzl (2.45 g, 4.02 mmol) をメタノール (10 ml) に溶解し、Pd-C (500 mg) を加え、水素雰囲気下、室温で 3 時間攪拌した。反応確認後 Pd-C を濾過し、メタノールを留去してフォーム状の目的物を得た。収量 1.98 g (3.81 mmol, 95%)。

20 (10) Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-L-Lys(For, OBzl)-OTmse の合成

氷冷下 Boc-L-Lys(For, OBzl)-OTmse (338 mg, 0.7 mmol) にTFA (1 ml) を加え、30 分放置した。TFA を留去した後、Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-OH (363 mg, 0.7 mmol) および HOBt · H₂O (160 mg, 1.05 mmol) を加え、DMF (1 ml) に溶解した。氷冷下 HBTU (398 mg, 1.05 mmol) および Et₃N (0.41 ml, 2.9 mmol) を加え、1 時間攪拌した。反応液を濃縮し、残渣を酢酸エチルで抽出した。10%

- 29 -

クエン酸水溶液、4% 炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水でそれぞれ3 回洗
浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、酢酸エチルを留去した。シリカゲルクロマト
グラフィーにより精製し、フォーム状の目的物を得た (column: Merck Kieselge
l 60 Φ 1.5x12 cm, eluent: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 99/1)。TLC: Rf, 0.3 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 49
5 /1)。収量 485 mg (0.55 mmol, 79%)。

(11) TFA・H-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-L-Lys(For, OBzl)-OH の合成

Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-L-Lys(For, OBzl)-OTmse (485 mg, 0.55 mmol)
をDMF (0.5 ml) に溶解し、1 M TBAF/THF (2.2 ml, 2.2 mmol) を加え、室温で 3
0 分放置した。反応液を濃縮し、残渣を酢酸エチルで抽出した。10% クエン酸水
10 溶液、蒸留水でそれぞれ3 回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥して酢酸エチルを
留去した。これに、氷冷下TFA (2 ml) を加え、30 分放置した。TFA を留去した
後、ジエチルエーテルおよび石油エーテルを加えて白色の粉末を得た。収量 489
mg (0.55 mmol, 100%)。

(12) cyclo(-L-Lys(For, OBzl)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pip-) およびcyclo(-L-Ly
15 s(For, OBzl)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pip-) の合成

TFA・H-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-L-Lys(For, OBzl)-OH (489 mg, 0.55 mmol)
を DMF (5 ml) に溶解した。DMF (275 ml) 中に、上記テトラペプチド/DMF 溶液
(1 ml)、HATU (63 mg, 0.16 mmol) および 0.076 M DIEA/DMF 溶液 (1 ml) を加
え、室温で 1 時間攪拌した。これを 5 回繰り返した後、反応液を濃縮して、残
20 渣を酢酸エチルで抽出した。10% クエン酸水溶液、4% 炭酸水素ナトリウム水溶
液、飽和食塩水でそれぞれ 3 回洗浄した。硫酸マグネシウムで乾燥後、酢酸エチ
ルを留去した。シリカゲルクロマトグラフィーで精製し、ジアステレオマー (LDL
L-体 および LDLD-体) の分離を行い、それぞれフォーム状の目的物を得た (colu
mn: Merck Kieselgel 60 Φ 1.5x35 cm, eluent: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 99/1)。LDLL-体:
25 収量 88 mg (0.13 mmol, 24%)、TLC: Rf, 0.8 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9/1)、RP-HPLC rete
ntion time: 22.44 min (column: WakoPak C18 Φ 4.6x150 mm, eluent: CH_3CN 1

- 30 -

0-100%/0.1% TFA linear gradient over 30 min, flow rate: 1 ml/min)。LDLD-
体: 収量 92 mg (0.14 mmol, 25%)、TLC: R_f, 0.9 (CHCl₃/MeOH, 9/1)、RP-HPLC
retention time: 24.59 min (column: WakoPak C18 Φ4.6x150 mm, eluent: CH₃
CN 10-100%/0.1% TFA linear gradient over 30 min, flow rate: 1 ml/min)。

5 (13) cyclo(-L-Lys(For, OH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pip-) の合成

cyclo(-L-Lys(For, OBzl)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pip-) (88 mg, 0.13 mmol) をメ
タノール (2 ml) に溶解し、Pd-C (100 mg) を加え、水素雰囲気下、室温で 1 時
間攪拌した。Pd-C を濾過し、メタノールを留去した。凍結乾燥を行い、白色粉末
を得た。収量 76 mg (0.13 mmol, 100%)。RP-HPLC retention time: 17.78 min
10 (column: WakoPak C18 Φ4.6x150 mm, eluent: CH₃CN 10-100%/0.1% TFA linear
gradient over 30 min, flow rate: 1 ml/min)。FABMS (matrix: 2, 2'-dithiodiethanol): m/z, 574.3228 [M+H]⁺ (Calcd., 573.3163, C₂₉H₄₃O₇N₅)。

(14) cyclo(-L-Lys(For, OH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pip-) の合成

cyclo(-L-Lys(For, OBzl)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pip-) (92 mg, 0.14 mmol) をメ
15 タノール (2 ml) に溶解した。Pd-C (100 mg) を加え、水素雰囲気下、室温で 1
時間攪拌した。HPLC にて反応確認後、Pd-C を濾過し、メタノールを留去した。
凍結乾燥を行い、白色粉末を得た。収量 75 mg (0.13 mmol, 93%)。RP-HPLC rete
ntion time: 19.57 min (column: WakoPak C18 Φ4.6x150 mm, eluent: CH₃CN 1
0-100%/0.1% TFA linear gradient over 30 min, flow rate: 1 ml/min)。FABMS
20 (matrix: 2, 2'-dithiodiethanol): m/z, 574.3230 [M+H]⁺ (Calcd., 573.3163,
C₂₉H₄₃O₇N₅)。

実施例 3. cyclo(-L-Hly(For, OH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pip-) および cyclo(-L-
Hly(For, OH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pip-) の合成

(1) Boc-L-Ab7-OTmse の合成

25 Boc-L-Ab7-OH (2.7 g, 8.3 mmol) および Tmse-OH (2.37 ml, 16.6 mmol) を D
CM (4 ml) に溶解し、氷冷下 DMAP (101 mg, 0.83 mmol) および DCC (2.05 g, 9.

- 31 -

96 mmol) を加え、6 時間攪拌した。反応液を濃縮し、酢酸エチルで抽出を行った。
10% クエン酸水溶液、4% 炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水でそれぞれ 3
回洗浄し、硫酸マグネシウム乾燥後、酢酸エチルを留去した。シリカゲルクロマ
トグラフィーで精製し、油状の目的物を得た (column: Merck Kieselgel 60 Φ 3.
5 4x20 cm, eluent: AcOEt/hexane, 1/8)。TLC: Rf, 0.85 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 49/1)。
収量 1.92 mg (4.54 mmol, 55%)。

(2) ギ酸 O-ベンジルヒドロキシアミドの合成

O-ベンジルヒドロキシルアミン塩酸塩 (3.19 g, 20 mmol) をクロロホルムに溶
解し、4% 炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、炭酸ナトリウムで乾燥後、クロ
10 ロホルムを留去した。これをギ酸 (20 ml) に溶解した。一方氷冷下で無水酢酸
(7.5 ml, 80 mmol) をギ酸 (40 ml) に加え 30 分間放置した。これに、上記O-ベ
ンジルヒドロキシルアミンのギ酸溶液を加え、24時間攪拌した。反応液を濃縮し、
残渣を酢酸エチルで抽出した。10% クエン酸水溶液、4% 炭酸水素ナトリウム水
溶液、飽和食塩水でそれぞれ 3 回洗浄し、炭酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチル
15 を留去した。シリカゲルクロマトグラフィーで精製し、シロップ状の目的物を得
た (column: Merck Kieselgel 60 Φ 5.0x12 cm, eluent: AcOEt/hexane, 1/1)。
TLC: Rf, 0.3 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 49/1)。収量 1.69 g (11.2 mmol, 56%)。

(3) Boc-L-Hly(For, OBzl)-OTmse の合成

Boc-L-Ab7-OTmse (846 mg, 2.0 mmol)、ギ酸 O-ベンジルヒドロキシルアミド
20 (453 mg, 3.0 mmol)、ヨウ化カリウム (166 mg, 1.0 mmol) および炭酸カリウム
(1.20 g, 8.0 mmol) を無水アセトン (40 ml) に溶解し、90℃ で 4 日間還流を
行った。反応液を濾過後、濃縮した。ジエチルエーテルで抽出し、0.5 N 水酸化
ナトリウム水溶液で 1 回、蒸留水で 2 回洗浄した後、無水炭酸ナトリウムで乾
燥し、ジエチルエーテルを留去した。シリカゲルクロマトグラフィーで精製し、
25 油状の目的物を得た (column: Merck Kieselgel 60 Φ 2.4x15 cm, eluent: AcOEt
/hexane, 1/3)。TLC: Rf, 0.5 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 49/1)。収量 235 mg (0.48 mmol,

- 32 -

24%)。

(4) Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-L-Hly(For, OBzl)-OTmse の合成

氷冷下 Boc-L-Hly(For, OBzl)-OTmse (235 mg, 0.48 mmol) に TFA (1 ml) を加え、30 分放置した。TFA を留去した後、Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-OH (233 mg, 0.45 mmol) および HOBt・H₂O (110 mg, 0.72 mmol) を加え、DMF (1 ml) に溶解した。氷冷下 HBTU (273 mg, 0.72 mmol) および Et₃N (0.27 ml, 1.9 mmol) を加え、1 時間攪拌した。反応液を濃縮し、残渣を酢酸エチルで抽出した。10% クエン酸水溶液、4% 炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水でそれぞれ 3 回洗浄し、硫酸マグネシウム乾燥後、酢酸エチルを留去した。シリカゲルクロマトグラフィーで精製し、フォーム状の目的物を得た (column: Merck Kieselgel 60 Φ2.4x20 cm, eluent: CHCl₃/MeOH, 99/1)。TLC: R_f, 0.65 (CHCl₃/MeOH, 9/1)。収量 289 mg (0.32 mmol, 71%)。

(5) TFA・H-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-L-Hly(For, OBzl)-OH の合成

Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-L-Hly(For, OBzl)-OTmse (289 mg, 0.32 mmol) を DMF (1 ml) に溶解させ、1 M TBAF / THF (0.7 ml, 0.7 mmol) を加え、30 分放置した。反応液を濃縮後、酢酸エチルで抽出した。10% クエン酸水溶液、蒸留水でそれぞれ 3 回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、酢酸エチルを留去した。これに、氷冷下 TFA (3 ml) を加え、30 分放置した。TFA を留去した後、ジエチルエーテルおよび石油エーテルを加えて白色の粉末を得た。収量 261 mg (0.32 mmol, 100%)。

(6) cyclo(-L-Hly(For, OBzl)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pip-) および cyclo(-L-Hly(For, OBzl)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pip-) の合成

TFA・H-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-L-Hly(For, OBzl)-OH (261 mg, 0.32 mmol) を DMF (3 ml) に溶解した。DMF (270 ml) 中に、上記テトラペプチド/DMF 溶液 (1 ml)、HATU (62 mg, 0.16 mmol) および 0.075 M DIEA/DMF 溶液 (1 ml) を加え、室温で 45 分間攪拌した。これを 3 回繰り返した後、反応液を濃縮した。酢

- 33 -

酸エチルで抽出し、10% クエン酸水溶液、4% 炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水でそれぞれ 3 回洗浄し、硫酸マグネシウム乾燥後、酢酸エチルを留去した。シリカゲルクロマトグラフィーで精製し、ジアステレオマー (LDLL-体および LDLD-体) の分離を行った (column: Merck Kieselgel 60 Φ 1.5x36 cm, eluent: C

5 HCl_3/MeOH , 99/1)。LDLL-体: 収量 61 mg (0.090 mmol, 28%)、TLC: Rf, 0.55 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9/1)、RP-HPLC retention time: 22.40 min (column: YMC-Pack C8 Φ 4.6x150 mm, eluent: CH_3CN 10-100%/0.1% TFA linear gradient over 30 min, flow rate: 1 ml/min)。LDLD-体: 収量 60 mg (0.089 mmol, 28%)、TLC: Rf, 0.65 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9/1)、RP-HPLC retention time: 24.29 min (column: YMC-Pack

10 C8 Φ 4.6x150 mm, eluent: CH_3CN 10-100%/0.1% TFA linear gradient over 30 min, flow rate: 1 ml/min)。

(7) cyclo(-L-Hly(For, OH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pip-) の合成

cyclo(-L-Hly(For, OBzl)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pip-) (61 mg, 0.090 mmol) を酢酸 (2 ml) に溶解した。Pd-C (100 mg) を加え、水素雰囲気下、室温で 1 時間

15 攪拌した。Pd-C を濾過し、酢酸を留去した。凍結乾燥を行い、白色粉末を得た。収量 48 mg (0.082 mmol, 91%)。RP-HPLC retention time: 16.02 min (column: WakoPak C18 Φ 4.6x150 mm, eluent: CH_3CN 10-100%/0.1% TFA linear gradient over 30 min, flow rate: 1 ml/min)。FABMS (matrix: 2, 2'-dithiodoethano

1) : m/z, 588.3379 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Calcd., 587.3319, $\text{C}_{30}\text{H}_{45}\text{O}_7\text{N}_5$)。

20 (8) cyclo(-L-Hly(For, OH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pip-) の合成

cyclo(-L-Hly(For, OBzl)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pip-) (60 mg, 0.089 mmol) をメタノール (2 ml) に溶解し、Pd-C (100 mg) を加え、水素雰囲気下、室温で 1 時間攪拌した。Pd-C を濾過し、メタノールを留去した。凍結乾燥を行い、白色粉末を得た。収量 38 mg (0.065 mmol, 73%)。RP-HPLC retention time: 18.68 min (co

25 lumn: WakoPak C18 Φ 4.6x150 mm, eluent: CH_3CN 10-100%/0.1% TFA linear gradient over 30 min, flow rate: 1 ml/min)。FABMS (matrix: 2, 2'-dithiodiet

- 34 -

hanol): m/z , 588.3388 $[M+H]^+$ (Calcd., 587.3319, $C_{30}H_{45}O_7N_5$).

実施例 4. cyclo(-L-Hly(For, OH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-) の合成

(1) Boc-L-Ab7-OTmse の合成

Boc-L-Ab7-OH (1.46 g, 4.5 mmol) および Tmse-OH (0.77 ml, 5.4 mmol) を D
5 CM (10 ml) に溶解し、氷冷下で DMAP (55 mg, 0.45 mmol) および DCC (1.1 g, 5.
4 mmol) を加え、16 時間攪拌した。溶媒を留去し、酢酸エチルで抽出した。10%
クエン酸水溶液、4% 炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水でそれぞれ 3 回洗
浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、酢酸エチルを留去した。シリカゲルクロマト
10 グラフィーで精製し、油状の目的物を得た (column: Merck Kieselgel 60 Φ 3.4x
30 cm, eluent: $CHCl_3$). TLC: Rf, 0.95 ($CHCl_3$ /MeOH, 9/1)。収量 1.25 g (3.0 m
mol, 67%)。

(2) Boc-L-Hly(For, OBzl)-OTmse の合成

Boc-L-Ab7-OTmse (2.3 g, 5.5 mmol)、ギ酸 O-ベンジルヒドルキシルアミド (1.
45 g, 9.6 mmol)、ヨウ化カリウム (465 mg, 2.8 mmol) および炭酸カリウム (3.
15 04 g, 22 mmol) を無水アセトン (50 ml) に溶解させ、90°C で 36 時間還流を行
った。反応液を濾過後、濃縮した。ジエチルエーテルで抽出し、0.5 N 水酸化ナ
トリウム水溶液で 1 回、蒸留水で 2 回洗浄した後、硫酸マグネシウムで乾燥し、
ジエチルエーテルを留去した。シリカゲルクロマトグラフィーで精製し、油状の
目的物を得た (column: Merck Kieselgel 60 Φ 3.4x30 cm, eluent: $CHCl_3$ /MeOH,
20 49/1)。TLC: Rf, 0.4 ($CHCl_3$ /MeOH, 49/1)。収量 1.33 g (2.7 mmol, 49 %)。

(3) Boc-L-Ile-L-Pro-OBzl の合成

Boc-L-Ile-OH \cdot 1/2 H_2O (1.19 g, 5.0 mmol) および $HCl \cdot H-L-Pro-OBzl$ (1.02
g, 5.0 mmol) を DMF (10 ml) に溶解し、氷冷下 $HOBt \cdot H_2O$ (765 mg, 5.0 mmol)、
DCC (1.24 g, 6.0 mmol) および Et_3N (0.7 ml, 5.0 mmol) を加え 16 時間攪拌し
25 た。溶媒を留去し、残渣を酢酸エチルで抽出した。10% クエン酸水溶液、4% 炭酸
水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水でそれぞれ 3 回洗浄し、硫酸マグネシウムで

- 35 -

乾燥後、酢酸エチルを留去した。シリカゲルクロマトグラフィーで精製し、油状の目的物を得た (column: Merck Kieselgel 60 Φ 3.4x30 cm, eluent: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 49/1)。TLC: Rf, 0.8 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 19/1)。収量 1.00 g (2.6 mmol, 52 %)。

(4) Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-OBzl の合成

- 5 氷冷下 Boc-L-Ile-L-Pro-OBzl (1.00 g, 2.6 mmol) に TFA (4 ml) を加え、30 分間放置した。TFA を留去し、減圧下で乾燥した。これを DMF (6 ml) に溶解し、Boc-D-Tyr(Me)-OH (770 mg, 2.6 mmol) を加え、続いて氷冷下 HOBt \cdot H_2O (597 mg, 3.9 mmol)、HBTU (1.50 g, 3.9 mmol) および Et_3N (0.88 ml, 6.3 mmol) を加え 16 時間攪拌した。反応液を濃縮し、酢酸エチルで抽出した。10% クエン酸水溶液、4% 炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水でそれぞれ 3 回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、酢酸エチルを留去した。シリカゲルクロマトグラフィーで精製し、フォーム状の目的物を得た (column: Merck Kieselgel 60 Φ 3.4x30 cm, eluent: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 99/1)。TLC: Rf, 0.45 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 19/1)。収量 1.17 g (2.06 mmol, 79 %)。
- 10

15 (5) Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-OH の合成

Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-OBzl (595 mg, 1.0 mmol) をメタノール (10 ml) に溶解し、Pd-C (200 mg) を加え、水素雰囲気下で 3 時間攪拌した。Pd-C を濾過し、メタノールを留去し、フォーム状の目的物を得た。収量 380 mg (0.8 mmol, 80%)

20 (6) Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-L-Hly(For, OBzl)-OTmse の合成

- 氷冷下 Boc-L-Hly(For, OBzl)-OTmse (394 mg, 0.8 mmol) に TFA (2 ml) を加え、30 分間放置した。TFA を留去し、減圧乾燥した。これを DMF (2 ml) に溶解し、Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-OH (380 mg, 0.8 mmol) を加え、氷冷下 HOBt \cdot H_2O (183 mg, 1.2 mmol)、HBTU (461 mg, 1.2 mmol) および Et_3N (0.23 ml, 1.6 mmol) を加え 16 時間攪拌した。反応液を濃縮し、酢酸エチルで抽出し、10% クエン酸水溶液、4% 炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水でそれぞれ 3 回洗浄
- 25

- 36 -

し、硫酸マグネシウムで乾燥後、酢酸エチルを留去した。シリカゲルクロマトグラフィーで精製し、フォーム状の目的物を得た (column: Merck Kieselgel 60 Φ 3.4x30 cm, eluent: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 99/1)。TLC: Rf, 0.6 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 19/1)。収量 470 mg (0.55 mmol, 69 %)。

5 (7) TFA \cdot H-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-L-Hly(For, OBzl)-OH の合成

Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-L-Hly(For, OBzl)-OTmse (470 mg, 0.55 mmol) を DMF (2 ml) に溶解させ、1 M TBAF/THF (1.9 ml, 1.9 mmol) を加え室温で 2 時間放置した。反応液を濃縮し、酢酸エチルで抽出し、10% クエン酸水溶液、蒸留水でそれぞれ 3 回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、酢酸エチルを留去した。

10 これに氷冷下 TFA (2 ml) を加え、30 分放置した。TFA 留去後、ジエチルエーテルを加えて白色粉末を得た。収量 437 mg (0.55 mmol, 100%)。

(8) cyclo(-L-Hly(For, OBzl)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-) の合成

TFA \cdot H-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-L-Hly(For, OBzl)-OH (437 mg, 0.55 mmol) を DMF (5 ml) に溶解した。DMF (160 ml) 中に上記テトラペプチド/DMF 溶液 (1 m
15 1)、HATU (63 mg, 0.017 mmol) および 0.057 M DIEA/DMF 溶液 (1 ml, 0.33 mmol) を加え、室温で 30 分攪拌した。これを 3 回繰り返した後、反応液を濃縮した。酢酸エチルで抽出し、10% クエン酸水溶液、4% 炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水でそれぞれ 3 回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、酢酸エチルを留去した。シリカゲルクロマトグラフィーで精製し、白色粉末を得た (column: Mer
20 ck Kieselgel 60 Φ 1.5x30 cm, eluent: CHCl_3)。TLC: Rf, 0.55 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 19/1)。収量 160 mg (0.24 mmol, 44%)。RP-HPLC retention time: 7.2 min (column: Chromolith performance RP-18e, eluent: CH_3CN 10-100%/0.1% TFA linear gradient over 15 min, flow rate: 2 ml/min)。HR-FABMS (matrix: 2, 2'-dithiodiethanol): m/z, 664.3735 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Calcd., 663.3632, $\text{C}_{36}\text{H}_{50}\text{O}_7\text{N}_5$)。

25 (9) cyclo(-L-Hly(For, OH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-) の合成

cyclo(-L-Hly(For, OBzl)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pro-) (160 mg, 0.24 mmol) を

- 37 -

酢酸 (3 ml) に溶解し、Pd-硫酸バリウム (100 mg) を加え、水素雰囲気下、室温で5時間攪拌した。Pd-硫酸バリウムを濾過し、溶媒を留去し、ジエチルエーテルで結晶化した。収量 68 mg (0.12 mmol, 50%)。RP-HPLC retention time: 6.2 min (column: Chromolith performance RP-18e, eluent: CH₃CN 10-100%/0.1% TFA linear gradient over 15 min, flow rate: 2 ml/min)。HR-FABMS (matrix: 2, 2'-dithiodiethanol): m/z, 574.3259 [M+H]⁺ (Calcd., 573.3163, C₂₉H₄₄O₇N₅)。

実施例 5. cyclo(-L-Hly(For, OH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) の合成

(1) Boc-L-Ile-D-Pro-OBzl の合成

Boc-L-Ile-OH · 1/2 H₂O (1.39 g, 6.0 mmol) および HCl · H-D-Pro-OBzl (956 mg, 4.0 mmol) を DMF (10 ml) に溶解し、氷冷下 HOBt · H₂O (613 mg, 4.0 mmol)、DCC (1.24 g, 6.0 mmol) および Et₃N (0.70 ml, 4.0 mmol) を加え 8 時間攪拌した。反応液を濃縮し、酢酸エチルで抽出し、10% クエン酸水溶液、4% 炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水でそれぞれ 3 回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、酢酸エチルを留去した。シリカゲルクロマトグラフィーで精製し、油状物を得た (column: Merck Kieselgel 60 Φ3.4x30 cm, eluent: CHCl₃/MeOH, 99/1)。TLC: R_f, 0.92 (CHCl₃/MeOH, 9/1)。収量 1.63 g (3.38 mmol, 85%)。

(2) Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl の合成

氷冷下 Boc-L-Ile-D-Pro-OBzl (1.63 g, 3.38 mmol) に TFA (5 ml) を加え、30 分間放置した。TFA を留去し、減圧乾燥した。これを DMF (8 ml) に溶解し、Boc-D-Tyr(Me)-OH (1.50 g, 5.07 mmol) を加え、氷冷下 HOBt · H₂O (518 mg, 3.38 mmol), HBTU (1.92 g, 5.07 mmol) および Et₃N (2.37 ml, 16.9 mmol) を加え 3 時間攪拌した。反応液を濃縮し、酢酸エチルで抽出し、10% クエン酸水溶液、4% 炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水でそれぞれ 3 回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、酢酸エチルを留去した。シリカゲルクロマトグラフィーで精製し、フォーム状の目的物を得た (column: Merck Kieselgel 60 Φ3.4x30 cm, eluent: CHCl₃/MeOH, 99/1)。TLC: R_f, 0.89 (CHCl₃/MeOH, 9/1)。収量 1.44 g (2.42

- 38 -

mmol, 72 %).

(3) Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OH の合成

Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl (1.44 g, 2.42 mmol) をメタノール (12 ml) に溶解させ、Pd-C (150 mg) を加え、水素雰囲気下、室温で 5 時間撹拌を行った。Pd-C を濾過し、メタノールを留去し、フォーム状の目的物を得た。収量 1.21 g (2.4 mmol, 99%)。

(4) Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-L-Hly(For, OBzl)-OTmse の合成

氷冷下 Boc-L-Hly(For, OBzl)-OTmse (593 mg, 1.2 mmol) に TFA (5 ml) を加え、30 分間放置した。TFA を留去し、減圧乾燥した。これを DMF (3 ml) に溶解し、Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OH (660 mg, 1.3 mmol) を加え、氷冷下 HOBt・H₂O (230 mg, 1.5 mmol)、HBTU (760 mg, 2.0 mmol) および Et₃N (0.56 ml, 4.0 mmol) を加え 16 時間撹拌した。反応液を濃縮し、酢酸エチルで抽出し、10% クエン酸水溶液、4% 炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水でそれぞれ 3 回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、酢酸エチルを留去した。シリカゲルクロマトグラフィーで精製し、フォーム状の目的物を得た (column: Merck Kieselgel 60 Φ 3.4x30 cm, eluent: CHCl₃/MeOH, 99/1)。TLC: R_f, 0.7 (CHCl₃/MeOH, 9/1)。収量 830 mg (0.94 mmol, 83 %)。

(5) TFA・H-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-L-Hly(For, OBzl)-OH の合成

Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-L-Hly(For, OBzl)-OTmse (830 mg, 0.94 mmol) を DMF (2 ml) に溶解し、1 M TBAF/THF (1.9 ml, 1.9 mmol) を加え、室温で 2 時間放置した。反応液を濃縮し、酢酸エチルで抽出し、10% クエン酸水溶液、蒸留水でそれぞれ 3 回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、酢酸エチルを留去した。これに氷冷下 TFA (2 ml) を加え、30 分放置した。TFA 留去後、ジエチルエーテルを加えて、白色粉末を得た。収量 437 mg (0.78 mmol, 93%)。

(6) cyclo(-L-Hly(For, OBzl)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) の合成

TFA・H-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-Hly(For, OBzl)-OH (437 mg, 0.78 mmol) を D

- 39 -

MF (5 mL) に溶解した。DMF (160 mL) 中に上記テトラペプチド/DMF 溶液 (1 mL)、
HATU (89 mg, 0.23 mmol) および 0.081 M DIEA/DMF 溶液 (1 mL, 0.47 mmol) を
加え、室温で 30 分撹拌した。同様の操作を 5 回繰り返した後、反応液を濃縮し
た。酢酸エチルで抽出し、10% クエン酸水溶液、4% 炭酸水素ナトリウム水溶液、
5 飽和食塩水でそれぞれ 3 回洗浄した。硫酸マグネシウムで乾燥後、酢酸エチルを
留去した。シリカゲルクロマトグラフィーで精製し、白色粉末を得た (column: M
erck Kieselgel 60 Φ 1.5x30 cm, eluent: CHCl_3)。TLC: Rf, 0.65 (CHCl_3 /MeOH,
9/1)。収量 340 mg (0.51 mmol, 66%)。RP-HPLC retention time: 8.2 min (col
umn: Chromolith performance RP-18e, eluent: CH_3CN 10-100%/0.1% TFA linear
10 gradient over 15min, flow rate: 2 mL/min)。HR-FABMS (matrix: 2, 2'-dith
iodiethanol): m/z, 664.3700 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Calcd., 663.3632, $\text{C}_{36}\text{H}_{50}\text{O}_7\text{N}_5$)。

(7) cyclo(-L-Hly(For, OH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) の合成

cyclo(-L-Hly(For, OBzl)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (200 mg, 0.30 mmol) を
メタノール (3 mL) に溶解し、Pd-硫酸バリウム (100 mg) を加え、水素雰囲気下、
15 室温で 15 時間撹拌した。Pd-硫酸バリウム触媒を濾過した後、溶媒を留去した。
凍結乾燥で白色粉末を得た。収量 119 mg (0.21 mmol, 70%)。RP-HPLC retention
time: 7.0 min (column: Chromolith performance RP-18e, eluent: CH_3CN 10-1
00%/0.1% TFA linear gradient over 15min, flow rate: 2 mL/min)。HR-FABMS
(matrix: 2, 2'-dithiodiethanol): m/z, 574.3229 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Calcd., 573.3163,
20 $\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{O}_7\text{N}_5$)。

実施例 6. cyclo(-L-A2oc(For, OH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pip-) および cyclo(-
L-A2oc(For, OH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pip-) の合成

(1) Boc-L-Ab8-OTmse の合成

Boc-L-Ab8-OH (3.37 g, 10 mmol) および Tmse-OH (2.86 mL, 20 mmol) を DCM
25 (5 mL) に溶解させ、氷冷下、DMAP (122 mg, 1.0 mmol) および DCC (2.48 g, 12
mmol) を加え、6 時間撹拌した。反応液を濃縮し、残渣を酢酸エチルで抽出した。

- 40 -

10% クエン酸水溶液、4% 炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水でそれぞれ 3 回洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥後、酢酸エチルを留去した。シリカゲルクロマトグラフィーで精製し、油状の目的物を得た (column: Merck Kieselgel 60 Φ 3.4 \times 15 cm, eluent: AcOEt/hexane, 1/8)。TLC: Rf, 0.9 (CHCl₃/MeOH, 9/1)。

5 収量 4.20 mg (9.60 mmol, 96%)。

(2) Boc-L-A2oc(For, OBzl)-OTmse の合成

Boc-L-Ab8-OTmse (2.39 g, 5.50 mmol)、ギ酸 0-ベンジルヒドロキシルアミド (1.24 g, 8.2 mmol)、ヨウ化カリウム (456 mg, 2.75 mmol) および炭酸カリウム (3.30 g, 22 mmol) を無水アセトン (110 ml) に溶解し、90°C で 6 日間還流した。反応液を濾過後、濃縮した。ジエチルエーテルで抽出し、5 N 水酸化ナトリウム水溶液で 1 回、蒸留水で 3 回洗浄した後、炭酸ナトリウムで乾燥後、ジエチルエーテルを留去した。シリカゲルクロマトグラフィーで精製し、油状の目的物を得た (column: Merck Kieselgel 60 Φ 3.4 \times 20 cm, eluent: AcOEt/hexane, 1/4)。TLC: Rf, 0.5 (CHCl₃/MeOH, 49/1)。収量 814 mg (1.60 mmol, 29%)。

15 (3) Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-L-A2oc(For, OBzl)-OTmse の合成

氷冷下 Boc-L-A2oc(For, OBzl)-OTmse (487 mg, 0.96 mmol) に TFA (2 ml) を加え、30 分放置した。TFA を留去した後、Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-OH (841 mg, 1.61 mmol) および HOBt \cdot H₂O (230 mg, 1.50 mmol) を加え、DMF (2 ml) に溶解した。氷冷下 HBTU (569 mg, 1.50 mmol) および Et₃N (0.60 ml, 4.30 mmol) を加え、1 時間攪拌した。反応液を濃縮し、残渣を酢酸エチルで抽出した。10% クエン酸水溶液、4% 炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水でそれぞれ 3 回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、酢酸エチルを留去した。シリカゲルクロマトグラフィーで精製し、フォーム状の目的物を得た (column: Merck Kieselgel 60 Φ 2.4 \times 13 cm, eluent: CHCl₃/MeOH, 99/1)。TLC: Rf, 0.65 (CHCl₃/MeOH, 9/1)。

25 1)。収量 213 mg (0.23 mmol, 24%)。

(4) TFA \cdot H-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-L-A2oc(For, OBzl)-OH の合成

- 41 -

Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-L-A2oc(For, OBzl)-OTmse (213 mg, 0.23 mmol) を DMF (0.5 ml) に溶解させ、1 M TBAF/THF (0.5 ml, 0.5 mmol) を加え、室温で 30 分放置した。反応液を濃縮後、酢酸エチルで抽出した。10% クエン酸水溶液および蒸留水でそれぞれ 3 回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、酢酸エチルを留去した。残った油状物に、氷冷下 TFA (2 ml) を加え、30 分放置した。TFA を留去後、ジエチルエーテルおよび石油エーテルを加え、白色粉末を得た。収量 186 mg (0.23 mmol, 100%)。

(5) cyclo(-L-A2oc(For, OBzl)-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-) の合成

TFA · H-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-L-A2oc(For, OBzl)-OH (261 mg, 0.32 mmol) を DMF (3 ml) に溶解した。DMF (200 ml) 中に、上記テトラペプチド/DMF 溶液 (1 ml)、HATU (44 mg, 0.12 mmol) および 0.053 M DIEA/DMF 溶液 (1 ml) を加え、室温で 40 分間攪拌した。これを 3 回繰り返した後、反応液を濃縮した。酢酸エチルで抽出し、10% クエン酸水溶液、4% 炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水でそれぞれ 3 回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、酢酸エチルを留去した。

シリカゲルクロマトグラフィーで精製し、フォーム状の目的物を得た (column: Merck Kieselgel 60 Φ 1.5x35 cm, eluent: CHCl₃/MeOH, 99/1)。収量 47 mg (0.068 mmol, 21%)。LDLL-体: TLC: R_f, 0.6 (CHCl₃/MeOH, 9/1)、RP-HPLC retention time: 24.02 min (column: WakoPak C18 Φ 4.6x150 mm, eluent: CH₃CN 10-100%/0.1% TFA linear gradient over 30 min, flow rate: 1 ml/min)。LDLD-体: TLC: R_f, 0.65 (CHCl₃/MeOH, 9/1)、RP-HPLC retention time: 26.56 min (column: WakoPak C18 Φ 4.6x150 mm, eluent: CH₃CN 10-100%/0.1% TFA linear gradient over 30 min, flow rate: 1 ml/min)。

(6) cyclo(-L-A2oc(For, OH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-L-Pip-) および cyclo(-L-A2oc(For, OH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pip-) の合成

cyclo(-L-A2oc(For, OBzl)-D-Tyr(Me)-L-Ile-DL-Pip-) (47 mg, 0.068 mmol) を酢酸 (1 ml) に溶解した。Pd-C (100 mg) を加え、水素雰囲気下、室温で 1 時

- 42 -

間攪拌した。Pd-C を濾過し、酢酸を留去した。HPLC 分取により、ジアステレオマー (LDLL-体およびLDLD-体) の分離、精製を行った。凍結乾燥により、それぞれ白色の粉末を得た (column: YMC-Pack C8 Φ 10x250 mm, eluent: CH₃CN 44-53% /0.1% TFA linear gradient over 20 min, flow rate: 3 ml/min)。LDLL-体: 収量 10 mg (0.017 mmol, 25%)、RP-HPLC retention time: 20.14 min (column: Wako Pak C18 Φ 4.6x150 mm, eluent: CH₃CN 10-100%/0.1% TFA linear gradient over 30 min, flow rate: 1 ml/min)。HR-FABMS (matrix: 2, 2'-dithiodiethanol): m/z, 602.3521 [M+H]⁺ (Calcd., 601.3476, C₃₁H₄₇O₇N₅)。LDLD-体: 収量 6 mg (0.010 mmol, 15%)、RP-HPLC retention time: 22.43 min (column: Wako Pak C18 Φ 4.6x150 mm, eluent: CH₃CN 10-100%/0.1% TFA linear gradient over 30 min, flow rate: 1 ml/min)。HR-FABMS (matrix: 2, 2'-dithiodiethanol): m/z, 602.3526 [M+H]⁺ (Calcd., 601.3476, C₃₁H₄₇O₇N₅)。

実施例 7. cyclo(-L-Am6(Tfacet)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) の合成

(1) Boc-L-Ab6-OBzl の合成

15 Boc-L-Ab6-OH (622 mg, 2.0 mmol) およびベンジルアルコール (0.26 ml, 2.4 mmol) をDCM (8 ml) に溶解させ、氷冷下で DMAP (24 mg, 0.2 mmol) および DCC (453 mg, 2.2 mmol) を加え一夜攪拌した。DCM を留去し、残渣に酢酸エチルを加え、10% クエン酸水溶液、4% 炭酸水素ナトリウム水溶液でそれぞれ 3 回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、酢酸エチルを留去した。真空乾燥後、フラッシュクロマトグラフィー (column: Merck Kieselgel 60 Φ 2.5x15 cm, eluent: C

20 HCl₃/MeOH, 99/1) で精製し、フォームを得た。収量 626 mg (1.6 mmol, 78%)。TLC: R_f, 0.94 (CHCl₃/MeOH, 9/1)。

(2) Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-L-Ab6-OBzl の合成

Boc-L-Ab6-OBzl (626 mg, 1.6 mmol) に氷冷下 TFA (2 ml) を加え、30 分間

25 0°C で放置し、Boc 基を除去した。TFA 留去後、減圧下乾燥し H-L-Ab6-OBzl · TFA の油状物を得た。これに Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OH (870 mg, 1.7 mmol)

- 43 -

を DMF (3 ml) に溶解し、氷冷下で HATU (712 mg, 1.9 mmol)、および Et₃N (0.7 ml, 4.8 mmol) を加え 3 時間攪拌した。DMF を留去し、残渣に酢酸エチルを加え、10% クエン酸水溶液、4% 炭酸水素ナトリウム水溶液でそれぞれ 3 回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、酢酸エチルを留去した。真空乾燥後、フラッシュ
5 ユクロマトグラフィー (column: Merck Kieselgel 60 Φ2.5x20 cm, eluent: CHCl₃/MeOH, 99/1) で精製し、フォームを得た。収量 1.1 g (1.4 mmol, 89 %)。TLC: Rf, 0.92 (CHCl₃/MeOH, 9/1)。

(3) Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-L-Ab6-OH の合成

Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-L-Ab6-OBzl (1.1 g, 1.4 mmol) をメタノールに溶解し、5% Pd-C (80 mg) を加えて H₂ ガスと 6 時間反応させた。メタノールを留去し、真空乾燥してフォームを得た。収量 925 mg (1.3 mmol, 96 %)。TLC: Rf, 0.52 (CHCl₃/MeOH, 9/1)。

(4) cyclo(-L-Ab6-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) の合成

Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-L-Ab6-OH (925 mg, 1.3 mmol) に氷冷下 TFA (3 ml) を加え、30 分間 0°C で放置し Boc 基を除去した。TFA を留去し、エーテル-石油エーテルを加えて白色粉末を得た。H-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-L-Ab6-OH · TFA, HBTU(759 mg, 2.0 mmol), HOBt (306 mg, 2.0 mmol) および DIEA (1.46 ml) を 5 分割して 30 分毎に DMF (240 ml) に加えて、環化反応を行った。2 時間後溶媒を留去して残渣を酢酸エチルに取り、10% クエン酸水溶液、4% 炭酸水素ナトリウム水溶液、および食塩水で 3 回洗い、硫酸マグネシウムで乾燥した。酢酸エチルを留去し、残った油状物をシリカゲルカラムで精製して、フォームを得た。収量 267 mg (0.43 mmol, 32%)。TLC: Rf, 0.82 (CHCl₃/MeOH, 9/1)。RP-HPLC retention time, 9.04 min. HR-FABMS (matrix: 2, 2'-dithiodiethanol): m/z, 579.2197 [M+H]⁺, (Calcd., 578.2132, C₂₇H₄₀O₅N₄S⁷⁹Br)。

25 (5) cyclo(-L-Am6(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) の合成

cyclo(-L-Ab6-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (230 mg, 0.40 mmol)、およびチオ酢

- 44 -

酸カリウム (69 mg, 0.60 mmol) のDMF (1.0 ml) 溶液にを加えて 3 時間反応させた。DMF を留去し、残渣を酢酸エチルに抽出し、10% クエン酸水溶液および飽和食塩水でそれぞれ 3 回洗い、硫酸マグネシウムで乾燥した。酢酸エチルを留去し、フォームを得た。収量 230 mg (>100 %)。TLC: Rf, 0.82 (CHCl₃/MeOH, 9/1)。

5 (6) cyclo(-L-Am6(Tfacet)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) の合成

cyclo(-L-Am6(Ac)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (114 mg, 0.20 mmol) のDMF (1 ml) 溶液にメタノール性アンモニア (1.0 ml) を作用させてアセチル基を除去した。溶媒留去後DMF (1.5 ml) に溶かし、3-Bromo-1,1,1-trifluoroacetone (0.062 ml, 0.60 mmol) および Et₃N (0.085 ml, 0.60 mmol) を加え、一夜反応させた。DMF
10 を留去し、残渣を酢酸エチルに抽出し、10% クエン酸水溶液および食塩水でそれぞれ 3 回洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した。酢酸エチルを留去して残った油状物をHPLCで精製し、白色粉末15 mg (12%)を得た。HR-FABMS (matrix: 2, 2' -dithiodiethanol): m/z, 643.2768 [M+H]⁺, (Calcd., 642.2707, C₃₀H₄₂O₆N₄F₃S)。

実施例 8. cyclo(-L-Tfm-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) の合成

15 (1) cyclo(-L-Asu(O⁻ · Li⁺)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) の合成

cyclo(-L-Asu(OBzl)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (410 mg, 0.63 mmol) をLiOH (53 mg, 1.2 mmol) と共にTHF (2 mL) および水 (2 ml) に溶解し、氷温で一夜攪拌した。溶媒を留去し、エーテルを加えて固化した。収量 355 mg (100%)。HPLC: 9.7 min (Chromolith, 10-100% CH₃CN gradient containing 0.1% TFA over 15
20 min)。

(2) cyclo(-L-Tfm-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) の合成:

cyclo(-L-Asu(O⁻ · Li⁺)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (355 mg, 0.63 mmol) を CH₂Cl₂ (10 ml) に溶解し、氷温で (CF₃CO)₂O (0.6 ml, 3.8 mmol) を加え、次いでピリジン (0.41 ml, 5 mmol) を加えて室温で 4 時間攪拌した。反応液に水 (10 ml)
25 1) を加えて振った後、目的化合物を CH₂Cl₂ に抽出した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥後留去し、残渣から目的化合物を HPLC で分離精製した。収量 155 mg

- 45 -

(40%)。HPLC: 8.0 min (Chromolith, 10-100% CH₃CN gradient containing 0.1% TFA over 15 min)。HR-FABMS (matrix: 2, 2' -dithiodiethanol): m/z, 611.3041 [M+H]⁺ (Calcd., 610.2966, C₃₀H₄₂O₆N₄F₃)。

実施例 9. cyclo(-L-Pfe-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) の合成

- 5 cyclo(-L-Asu(O⁻ · Li⁺)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) (355 mg, 0.63 mmol) を CH₂Cl₂ (10 ml) に溶解し、氷温で (CF₃CF₂CO)₂O (0.75 ml, 3.8 mmol) を加え、次いでピリジン (0.41 ml, 5 mmol) を加えて室温で 4 時間攪拌した。反応液に水 (10 ml) を加えて振った後、目的化合物を CH₂Cl₂ に抽出した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥後留去し、残渣から目的化合物を HPLC で分離精製した。収量 16 mg (5%)。HPLC: 8.8 min (hydrate) and 10.5 (keto) (Chromolith, 10-100% CH₃CN gradient containing 0.1% TFA over 15 min)。HR-FABMS (matrix: 2, 2' -dithiodiethanol): m/z, 661.3050 [M+H]⁺ (Calcd., 660.2955, C₃₁H₄₂F₅O₆N₄)。
- 10

実施例 10. cyclo(-L-Aph-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) の合成

(1) Boc-L-Aph-OTmse の合成

- 15 Boc-L-Ab7-OTmse (425 mg, 1 mmol) のアセトニトリル (2 ml) 溶液に、NaI (150 mg, 1 mmol) および P(OMe)₃ (500 mg, 4 mmol) を加え 70℃ で 20 時間攪拌した。アセトニトリルを留去し、残渣を酢酸エチルに抽出して水洗し、硫酸マグネシウムで乾燥後、酢酸エチルを留去して Boc-L-Aph-OTmse (440 mg, 98%) を得た。FABMS (matrix: 2, 2' -dithiodiethanol): m/z, 354 [M+H]⁺。

- 20 (2) Boc-L-Aph-OH の合成

Boc-L-Aph-OTmse (440 mg, 1 mmol) の DMF (1 ml) 溶液に、1 M TBAF/THF (2 ml) を加え、2 時間室温で攪拌した。DMF を留去した後残渣を酢酸エチルに溶解し、10% クエン酸水溶液および食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した。酢酸エチルを留去して Boc-L-Aph-OH (250 mg, 0.71 mmol, 70%) を得た。

- 25 (3) Boc-L-Aph-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl の合成

Boc-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl (416 mg, 0.7 mmol) を TFA (3 ml) で 30 分

- 46 -

処理し、TFA を留去して TFA・H-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl を得た。これに Boc-L-Aph-OH (250 mg, 0.71 mmol) の DMF (3 ml) 溶液、HBTU (400 mg, 1.05 mmol)、HOBt 107 mg, 0.7 mmol) および Et₃N (0.5 ml, 3.5 mmol) を加えて 0°C で終夜攪拌した。DMF を留去した後、残渣を酢酸エチルに抽出し、10% クエン酸水溶液、4% NaHCO₃ 水溶液、および飽和食塩水でそれぞれ 3 回洗浄した後、硫酸マグネシウムで乾燥した。酢酸エチルを留去し、カラムクロマトグラフィーで精製して、Boc-L-Aph-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl (200 mg, 0.24 mmol, 35%) を得た。MALDI-TOFMS: m/z, 854 [M+Na]⁺。

(4) cyclo(-L-Aph-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-) の合成

10 Boc-L-Aph-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OBzl (200 mg, 0.24 mmol) をメタノール中 5% Pd/C (50 mg) 存在下水素添加し、Boc-L-Aph-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro-OH (160 mg, 0.22 mmol, 92%) を得た。Boc 基を氷冷下 30 分の TFA (2 ml) 処理で除去し、ついで TFA を留去後、エーテルによって固化した。得られたテトラペプチド TFA 塩 (140 mg, 0.20 mmol) の DMF (75 ml) 溶液に、HATU (114 mg, 0.3 mmol) および DIEA (0.12 ml, 0.7 mmol) を加え室温で攪拌した。3 時間後、減圧下 DMF を留去し、残渣を酢酸エチルに抽出し、10% クエン酸水溶液、4% NaHCO₃ 水溶液、および飽和食塩水でそれぞれ 3 回洗浄した後硫酸マグネシウムで乾燥した。酢酸エチルを留去し、残った油状物をカラムクロマトグラフィーで精製し、目的物 (15 mg, 0.024 mmol, 11%) を得た。HPLC retention time, 7.0 min (Chromolith, 10-100% CH₃CN gradient containing 0.1% TFA over 15 min)。HR-FABMS (matrix: 2, 2'-dithiodiethanol): m/z, 623.3177 [M+H]⁺ (Calcd, 623.3210, C₃₀H₄₇O₈N₄P)。

実施例 11. HDAC 酵素阻害活性の測定

本実施例では様々な官能基を置換基 X に有する環状テトラペプチド構造の化合物である N(OH)COH (n=4), N(OH)COH (n=5), N(OH)COH (n=6), COOH, COOMe, COOBzl, Tfk, Pfk, Mtfk, Stfk, SMe, SO₂Me, Aph の酵素阻害活性の測定を行った。

- 47 -

活性を測定した化合物の置換基の構造の一覧を図2に示す。天然のHDAC阻害剤である図3に示すようなCyl-1, Cyl-2 (Furumai et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 87-92.) を元に環状テトラペプチド構造のコンフォメーション及び活性基までの炭素鎖数を検討した。天然のCyl-1, Cyl-2は立体コンフォメーションがLDLL体であるが、本実施例ではLDLL体およびLDLDのコンフォメーションを持つものについても検討した。

HDAC阻害活性測定を行うにあたり、次の通りHDAC溶液を調製した。100 mm ディッシュに 1×10^7 個の293 T細胞をまき、24時間後にヒトHDAC1、4またはマウスHDAC6を発現するベクター ($1 \mu\text{g}$) をLipofectAmine 2000 reagent (Life Technologies, Inc. Gaithersburg, MD) を用いてトランスフェクションした。なお、上記ヒトHDAC1発現ベクターはp cDNA3-HD1 (Yang, W. M., Yao, Y. L., Sun, J. M., Davie, J. R. & Seto, E. (1997) J. Biol. Chem. 272, 28001-28007.)、ヒトHDAC4発現ベクターはp cDNA3.1 (+)-HD4 (Fischle, W., Emiliani, S., Hendzel, M. J., Nagase, T., Nomura, N., Voelter, W. & Verdin, E. (1999) J. Biol. Chem. 274, 11713-11720.)、マウスHDAC6発現ベクターはp cDNA-mHDA2/HDAC6 (Verdel, A. & Khochbin, S. (1999) J. Biol. Chem. 274, 2440-2445.) を用いた。

OPTI-MEM中で5時間ベクターを取り込ませた後、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) に培地を交換して19時間インキュベートした。細胞をPBSで洗った後、lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 120 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40) に懸濁し、ソニケーションした。上清を遠心分離により集め、ProteinA/G plus agarose beads (Santa Cruz Biotechnologies, Inc.) を用いて、非特異的タンパクを除いた。その後、HDAC1、HDAC4を発現させた細胞上清には、anti-FLAG M2抗体 (Sigma-Aldrich Inc.) を加え、HDAC6を発現させた

- 48 -

細胞上清には anti-HA 抗体 (clone 3F10, Roche Molecular Biochemicals) を加えて 4℃ で 1 時間反応させた。

これにアガロースビーズを加えて 4℃ で 1 時間反応させた後、lysis buffer でアガロースビーズを 3 回洗い、HD buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 10% グリセロール, a complete protease inhibitor cocktail (Boehringer Mannheim, Germany)) で 1 回洗った。HD buffer (200 μ l) 中 FLAG ペプチド (40 μ g) (Sigma-Aldrich Inc.) または HA ペプチド (100 μ g) で 4℃、1 時間インキュベートしてアガロースビーズから結合したタンパクを回収し、HDAC 反応溶液とし、以下の HDAC 阻害活性測定に用いた。

In vitro 系の HDAC 阻害活性を以下のように評価した。被験化合物を DMSO に溶解して、濃度 10 mM の原溶液を調製し、これを阻害剤の原溶液とした。アッセイは被験化合物存在下 HDAC 溶液とクマリンで標識したアセチル化ヒストンペプチド溶液を 37℃ で 30 分間インキュベートすることで行った (反応容積 20 μ l)。反応液に 30 μ l のトリプシンを添加して、酵素反応で切り放されたアミノメチルクマリンを蛍光プレートリーダーで測定した。なお陰性コントロールとして、阻害剤を反応系に添加せず、同じ操作を行った。阻害活性は、陰性コントロールにおける HDAC 活性の 50% 阻害濃度 (「IC₅₀ (μ M)」) で表した (表 1)。

また、*in vivo* 系の HDAC 阻害活性は p21 プロモーター誘導活性を指標に次の通り測定した。実験に用いた MFL-9 細胞はヒト野生型 p21 プロモーターとルシフェラーゼの融合遺伝子 (Dr. B. Vogelstein) を安定に保持した細胞であり、10% FBS を添加したフェノールレッド不含 DMEM 培地を用い、37℃、5% 二酸化炭素存在下、水蒸気飽和したインキュベーターを用いて培養を行った。この MFL-9 細胞を 85000 個/well の細胞密度で 96 穴マイクロプレートに播種し、各 well 当たり上記の培地 99 μ l 中で、6 時間培養した後、被験化合物溶液 1 μ l を添加し、引き続き 18 時間

- 49 -

培養した。また、ここでもTSAをHDAC阻害活性に起因するp21プロモーター誘導活性の陽性コントロール化合物とした。

Luc Lite (Packard BioScience Company) を用い、細胞内に発現しているルシフェラーゼの酵素反応の生成物に起因する発光強度を測定した。被験化合物の活性強度はTSAによる最大活性値の50%の値を示す時の濃度(「EC₅₀ (μM)」)を用いて比較した(表1)。

- 50 -

表 1

| X | IC50 (μM) | | | P21 プロモータ | |
|--------------------|-----------|-------|-------|-----------|------------------------------|
| | HDAC1 | HDAC4 | HDAC6 | EC50 (μM) | 構造 |
| N(OH)COH | 33.9 | 25.2 | 14.3 | >100 | Cyclo(X-y(Me)-l-pip), n=4 |
| N(OH)COH | 23.9 | 17.5 | 8.19 | >100 | Cyclo(X-y(Me)-l-Pip), n=4 |
| N(OH)COH | 0.067 | 0.13 | 0.18 | 3.73 | Cyclo(X-y(Me)-l-pip), n=5 |
| N(OH)COH | 6.36 | 7.02 | 12.2 | >100 | Cyclo(X-y(Me)-l-pip), n=6 |
| N(OH)COH | 13.5 | 18.9 | 11.2 | >100 | Cyclo(X-y(Me)-l-Pip), n=6 |
| N(OH)COH | 0.026 | 0.074 | 0.78 | 5.42 | Cyclo(X-y(Me)-l-p), n=5 |
| N(OH)COH | 0.033 | 0.090 | 0.029 | 61.1 | Cyclo(X-y(Me)-l-P), n=5 |
| COOH | 4.07 | 5.69 | >500 | >100 | Cyclo(X-y(Me)-l-p), n=5 |
| COOMe | 0.12 | 0.07 | >500 | 3.95 | Cyclo(X-y(Me)-l-p), n=5 |
| COOBzl | NT | NT | NT | >100 | Cyclo(X-y(Me)-l-p), n=5 |
| Tfk | 0.73 | 0.61 | 1.44 | 3.09 | Cyclo(X-y(Me)-l-p), n=5 |
| Pfek | 0.85 | 1.22 | 5.72 | >100 | Cyclo(X-y(Me)-l-p), n=5 |
| Mtfk | 0.047 | 0.19 | 0.95 | 6.64 | Cyclo(X-y(Me)-l-p), n=5 |
| Stfk | >500 | NT | NT | >100 | Cyclo(X-y(Me)-l-p), n=5 |
| SMe | >500 | >500 | >500 | >100 | Cyclo(X-y(Me)-l-p), n=5 |
| SO ₂ Me | >500 | >500 | >500 | >100 | Cyclo(X-y(Me)-l-p), n=5 |
| Aph | >500 | >500 | >500 | >100 | Cyclo(X-y(Me)-l-p), n=5 |
| TSA | 0.022 | 0.020 | 0.028 | 0.77 | |

表中y(Me)はD-Tyr(Me), Tyr(Me)はO-methyltyrosine, IはL-Ile, pipはD-pipecolic acid, PipはL-pipecolic acidを示す(アミノ酸は一文字表記で示しており、大文字はL体アミノ酸、小文字はD体アミノ酸を示す)。また、NTはテストしていないことを示す。

以上の結果より、X部位の構造が違うと各酵素サブタイプに対する阻害活性が大きく異なるという、酵素サブタイプ選択的な阻害活性を持つことが示された。

本発明の化合物はHDAC1, 4および6に対して強い阻害活性を示した。環状テトラペプチド構造を有する化合物はHDAC6を阻害することができないとされてきたが、本発明のようにテトラペプチド骨格の構造を変化させることでHDAC6に対しても阻害能を持たせることが可能となった。また、X部位の構造が違うと各酵素サブタイプに対する阻害活性が大きく異なり、本発明の化合物が酵素サブタイプ選択的な阻害活性を持つことが示された。

本発明の化合物の製造方法によりテトラペプチド骨格の構造を容易に変えることで、化合物の標的酵素に対する選択性を容易に変化させることが出来ると期待される。

実施例 12. 細胞レベルでのHDAC阻害活性の測定

チューブリンおよびヒストンのアセチル化レベルの測定は、HeLa細胞に対して被験化合物を作用させ、抗アセチル化リジン抗体を使用してチューブリンおよびヒストンのアセチル化レベルをウェスタンで確認することにより行った。詳細には、ヒト子宮がん細胞(HeLa)は10%FBSを添加したDMEM培地を用い、37°C、5%二酸化炭素存在下、水蒸気飽和したインキュベーターを用いて培養を行った。この細胞を15000個/mlの細胞密度で6穴プレートに2 ml播種し、18時間培養した後、被験化合物溶液を添加し、引き続き6時間培養した。細胞をPBSで洗った後、lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、120 mM NaCl、5 mM EDTA、0.5% Nonidet P-40)に懸濁し、ソニケーショ

- 52 -

ンした。上清を遠心分離により集め、SDS bufferと混合し、100℃で5分間処理したサンプルを15%SDSゲルで電気泳動後、メンブレンフィルムにトランスファーした。1次抗体としてAKL5C1(ジャパンエナジー)、2次抗体: anti-マウス(LIFE SCIENCE)で処理後ECL(amersham pharmacia biotech)処理し、アセチル化バンドの検出を行った(図4)。なお、図4において記載している化合物の濃度の単位は μM である。

図4に示す通り、p21プロモーター誘導活性測定の結果(EC_{50})と一致した阻害傾向が示された。また、TfkおよびN(OH)COH($n=5$)は細胞内でチューブリン脱アセチル化酵素を阻害し、チューブリンの高度なアセチル化を誘導した。このような酵素選択性は他の環状テトラペプチド構造を有するHDAC阻害剤にはなかった性質である。

実施例13. 細胞毒性テスト

Tfk, Pfek, MtfkおよびAphの細胞毒性テストをヒト肺正常細胞(TIG-3)、ヒト子宮がん細胞(HeLa)を用いて行った。これらTIG-3細胞、HeLa細胞を10%FBSを添加したDMEM培地を用い、37℃、5%二酸化炭素存在下、水蒸気飽和したインキュベーターを用いて培養を行った。TIG-3は15000個/well、HeLaは5000個/wellの細胞密度で96穴マイクロプレートに播種し、各well当たり上記の培地100 μl 中で18時間培養した後、培地に希釈した被験化合物溶液を添加し、引き続き48時間培養した。

各wellにCell Proliferation Kit II (XTT) (ロシュ・ダイアグノスティックス)の基質混合溶液を50 μl ずつ入れ、十分時間インキュベートして呈色反応をさせた。十分な呈色反応が進んだら、OD495 nmの発色強度をマイクロプレートリーダーで測定した。阻害活性は、遊離XTT率50%となるときの濃度を IC_{50} として示した。なお、がん細胞選択的細胞傷害活性の値(正常細胞TIG IC_{50} / がん細胞HeLa IC_{50})が高いほど、がん細胞選択的に細胞死を誘導していることを示す。

- 53 -

表 2

| 抑制剤 | IC ₅₀ (nM) | | がん細胞選択的 細胞傷害活性 |
|------|-----------------------|--------|-------------------|
| | HeLa | TIG-3 | |
| TSA | 12.3 | 151 | 12.3 |
| Tfk | 8.8 | 87.1 | 9.9 |
| Pfek | 616 | 13443 | 21.8 |
| Mtfk | 52.5 | 468 | 8.9 |
| Aph | >50000 | >50000 | - |

上記表 2 に示されている通り、本発明における化合物は TSA とほぼ同程度のがん細胞選択的に強い細胞傷害活性を有することが示された。

5 実施例 14. cyclo(L-Asu(OPD)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro) の合成

(1) cyclo(L-Asu-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro) の合成

既存の方法で合成した cyclo(L-Asu(OBzl)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro) (360 mg, 0.56 mmol) をメタノール(20 ml) に溶解し、Pd/C (100 mg) を加えて 5 時間接触水素還元した。触媒を濾去し、メタノールを留去して cyclo(L-Asu-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro) を得た。収量 310 mg (0.56 mmol, 100%)。

(2) cyclo(L-Asu(OPD)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro) の合成

cyclo(L-Asu-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro) (150 mg, 0.27 mmol) を DMF (2 ml) に溶解し、HOBt-H₂O (41 mg, 0.27 mmol)、HBTU (154 mg, 0.4 mmol)、o-phenylenediamine (58 mg, 0.54 mmol)、およびトリエチルアミン (0.12 ml, 0.8 mmol) を 0°C で加え 3 時間攪拌した。ゲル濾過クロマトグラフィーで精製し、cyclo(L-Asu(OPD)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro) を得た (column: Sephadex LH-20 Φ2.0x100 cm, eluent: DMF)。収量 140 mg (0.216 mmol, 80%)。

実施例 15. cyclo(L-Asu(OAPOH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro) および cyclo(L-Asu(OAPNH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro) の合成

20 実施例 1 と同様の方法で合成した cyclo(L-Asu-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro) (150 m

- 54 -

g, 0.27 mmol) をDMF (2 ml) に溶解し、HOBt-H₂O (41 mg, 0.27 mmol)、BOP 試薬 (179 mg, 0.4 mmol)、o-aminophenol (35 mg, 0.32 mmol)、およびトリエチルアミン (0.12 ml, 0.8 mmol) を0°C で加え3 時間攪拌した。ゲル濾過クロマトグラフィーで精製し、まずcyclo(L-Asu(OAPOH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro) を得た (column: Sephadex LH-20 Φ2.0x100 cm, eluent: DMF)。収量 70 mg (0.108 mmol, 40%) さらに溶出を続け cyclo(L-Asu(OAPNH)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro) を得た (column: Sephadex LH-20 Φ2.0x100 cm, eluent: DMF)。収量 50 mg (0.08 mmol, 30%) 。

実施例 16. cyclo(L-Asu(OATP)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro) dimer の合成

10 実施例 1 と同様の方法で合成したcyclo(L-Asu-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro) (125 mg, 0.22 mmol) をDMF (2 ml) に溶解し、HOBt-H₂O (34 mg, 0.22 mmol)、BOP 試薬 (146 mg, 0.33 mmol)、o-aminothiophenol (33 mg, 0.33 mmol)、およびトリエチルアミン (0.12 ml, 0.8 mmol) を0°C で加え、3 時間攪拌した。ゲル濾過クロマトグラフィーで精製し、cyclo(L-Asu(OATP)-D-Tyr(Me)-L-Ile-D-Pro) の SS-dimer 15 mer を得た (column: Sephadex LH-20 Φ2.0x100 cm, eluent: DMF)。収量 120 mg (0.09 mmol, 80%) 。このSS-dimer はジチオスレイトールで還元すると、容易にHS-体を与えた。

実施例 17. HDAC 酵素阻害活性の測定

OPD、OAPOH、OAPNH、OATPについて、*in vitro*系のHDAC阻害活性を評価した。20 実験方法は実施例 11 に準じた。活性を測定した化合物の構造の一覧を図 5 に示す。阻害活性は、陰性コントロールにおけるHDAC活性の50%阻害濃度(「IC₅₀ (μM)」)で表した(表 3)。

また、*in vivo*系のHDAC阻害活性はp21プロモーター誘導活性を指標に測定した。実験方法は実施例 11 に準じた。被験化合物の活性強度はTSAによる最大活性値の25 50%の値を示す時の濃度(「EC₅₀ (μM)」)を用いて比較した(表 3)。

- 55 -

表 3

| X | IC ₅₀ (μM) | | | p21プロモーター EC ₅₀ (μM) |
|-------|-----------------------|-------|-------|------------------------------------|
| | HDAC1 | HDAC4 | HDAC6 | |
| OPD | 4.04 | 15.7 | 321 | 30.9 |
| OAPOH | 1.22 | 0.23 | 5042 | 55.1 |
| OAPNH | 0.40 | 0.24 | 441 | 12.9 |
| OATP | 2.03 | 0.23 | 408 | >100 |

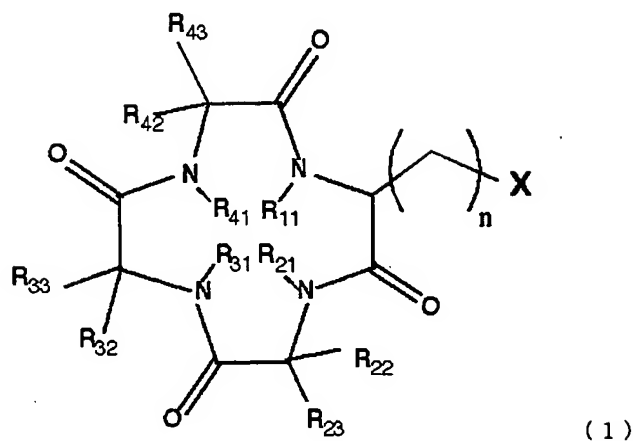
産業上の利用の可能性

- 本発明の化合物は、様々なサブタイプのHDACに対して強い阻害活性を示す。本
- 5 発明の化合物は、HDAC 1, 4 および 6 に関与している疾患の治療または予防のための薬剤として、利用し得る。また、本発明の化合物の製造方法により、種々のタイプの化合物を簡便に合成することができる。そのため、本発明の製造方法を用いることにより、テトラペプチド骨格の構造を様々な様態に変化させ、化合物の標的酵素に対する選択性を容易に変化させることが出来る。すなわち、本発明
- 10 の化合物の製造方法は、新たな性質を持ったHDAC阻害剤などの開発に寄与することが期待される。

- 56 -

請求の範囲

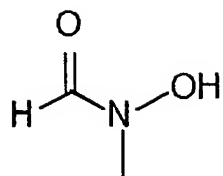
1. 以下の一般式（1）で示される化合物。



- 5 式中、 R_{11} , R_{21} , R_{31} , R_{41} はそれぞれ独立して水素またはメチル基を示す。 R_{22} , R_{23} , R_{32} , R_{33} , R_{42} , R_{43} はそれぞれ独立して水素、炭素数1～6の直鎖アルキル基、非芳香族環状アルキル基もしくは置換基を有することもある芳香環が結合した炭素数1～6の直鎖アルキル基、非芳香族環状アルキル基、または非芳香族環状アルキル基もしくは置換基を有することもある芳香環が結合した非芳香族環状アルキル基のいずれかを示す。また、 R_{21} と R_{22} , R_{22} と R_{23} , R_{31} と R_{32} , R_{32} と R_{33} , R_{41} と R_{42} , R_{42} と R_{43} は、それぞれ結合を持たず非環状構造を示すか、または鎖長炭素数1～5の直鎖アルキレン基、炭素数1～6の分岐鎖を有する鎖長炭素数1～5の直鎖アルキレン基、もしくは、炭素数1～6の環構造を備えた鎖長炭素数1～5の直鎖アルキレン基を介して結合した環構造を示す。 n はHDAC阻害活性を有する範囲で選択することができる。Xは、ヒストン脱アセチル化酵素の活性中心部に位置する亜鉛に配位することのできる構造を持つ任意の構造体を示す。

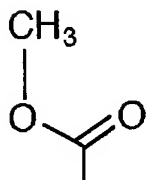
2. Xが以下の構造式で示す置換基のいずれかである、請求項1に記載の化合物。

- 57 -



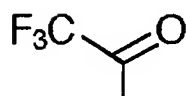
N(OH)COH

5



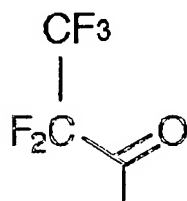
COOMe

10



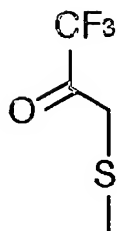
Tfk

15



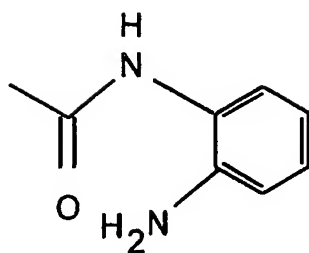
Pfk

20



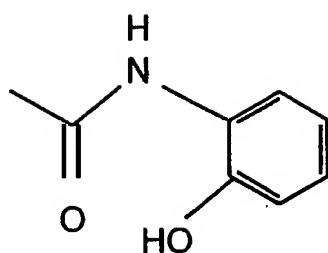
Mfk

25



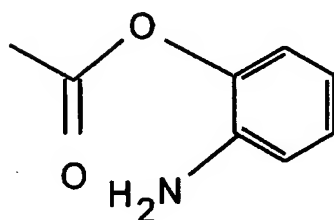
OPD

- 58 -



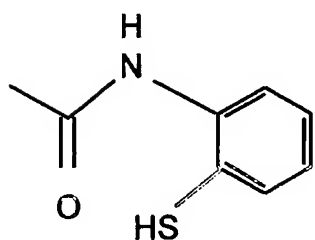
OAPOH

5



OAPNH

10



OATP

15

3. 請求項1記載の化合物を有効成分として含有する、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤。

4. 請求項1記載の化合物を有効成分として含有する、チューブリン脱アセチル化酵素阻害剤。

20 5. 請求項1記載の化合物を有効成分として含有する、アポトーシス誘導剤。

6. 請求項1記載の化合物を有効成分として含有する、分化誘導剤。

7. 請求項1記載の化合物を有効成分として含有する、血管新生阻害剤。

8. 請求項1記載の化合物を有効成分として含有する、がん転移抑制剤。

9. 請求項1記載の化合物を有効成分として含有する、ヒストン脱アセチル化酵素に起因した疾患の治療または予防のための薬剤。

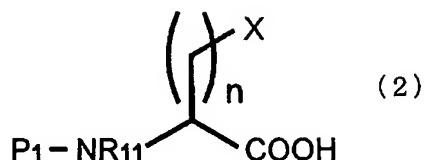
25

10. ヒストン脱アセチル化酵素に起因した疾患が、がん、自己免疫疾患、神経

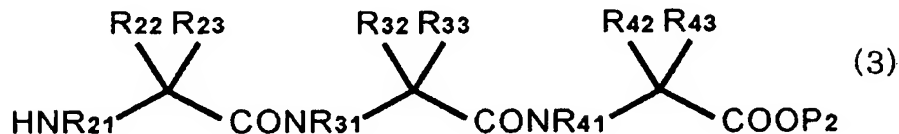
- 59 -

変性疾患、皮膚病、または感染症である、請求項 9 記載の治療または予防のための薬剤。

1 1. 一般式 (2)

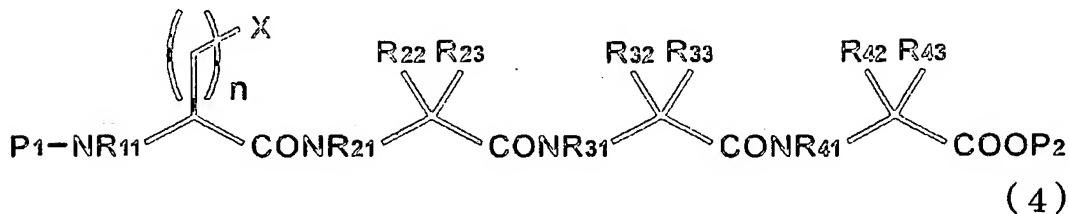


5 (式中、 n , R_{11} , X は請求項 1、2 で定義したものと同様であり、 P_1 はアミノ基の保護基を表す) で示される化合物を、一般式 (3)



(式中、 R_{11} , R_{21} , R_{22} , R_{23} , R_{31} , R_{32} , R_{33} , R_{41} , R_{42} , 及び R_{43} は、請求項 1 の一般式 (1) で定義したものと同様であり、 P_2 はカルボキシル基の保護基を表す) で示される化合物とペプチド結合剤の存在下で反応させ、一般式

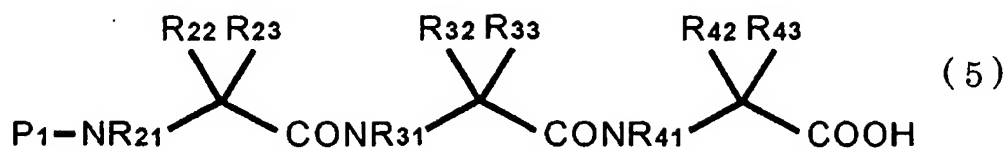
10 (4)



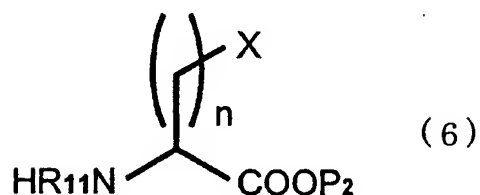
(式中、 n , R_{11} , R_{21} , R_{22} , R_{23} , R_{31} , R_{32} , R_{33} , R_{41} , R_{42} , R_{43} , P_1 , P_2 , 及び X は、前記で定義したものと同様である) で示される化合物を得、次いで前記一般式 (4) で示される化合物を、触媒的水素化、酸処理、もしくは加水分解により、 P_1 及び P_2 を除去した後に、ペプチド結合剤の存在下で環化反応させるか、または一般式 (5)

15

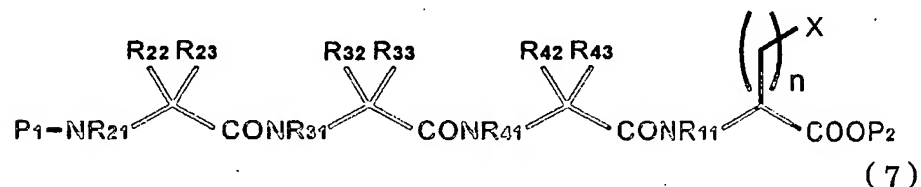
- 60 -



(式中、 R_{21} , R_{22} , R_{23} , R_{31} , R_{32} , R_{33} , R_{41} , R_{42} , R_{43} , 及び P_1 は、前記で定義したと同様である) で示される化合物を、一般式 (6)



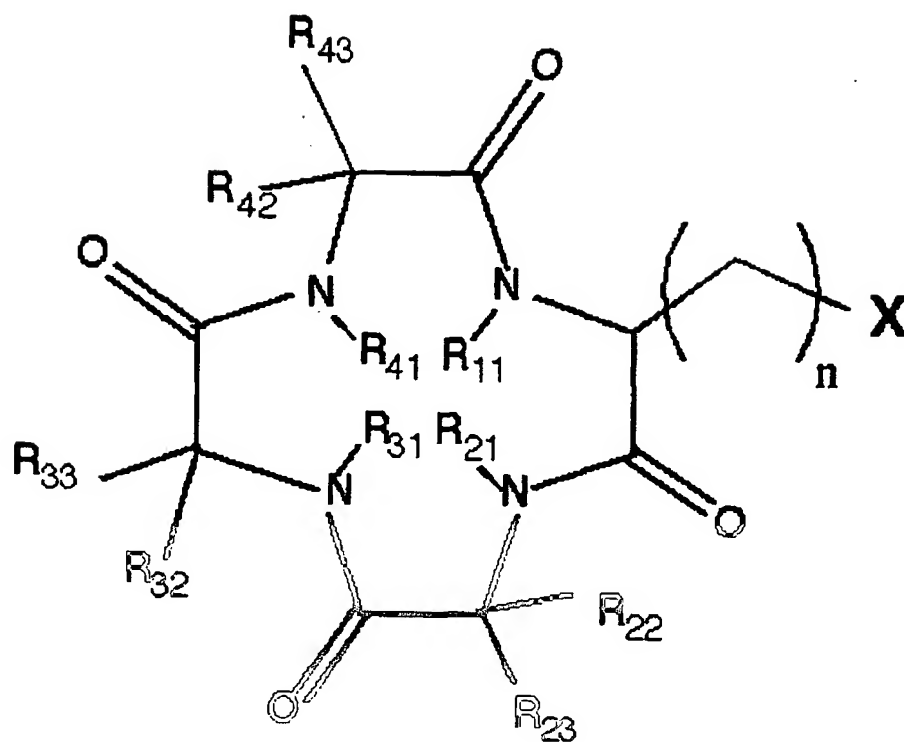
5 (式中、 n , R_{11} , P_2 , 及び X は、前記で定義したものと同様である)で示される化合物とペプチド結合剤存在下で反応させ、一般式(7)



(式中、 n , R_{11} , R_{21} , R_{22} , R_{23} , R_{31} , R_{32} , R_{33} , R_{41} , R_{42} , R_{43} , P_1 , P_2 , 及び X は、前記で定義したと同様である) で示される化合物を得、次いで一般式

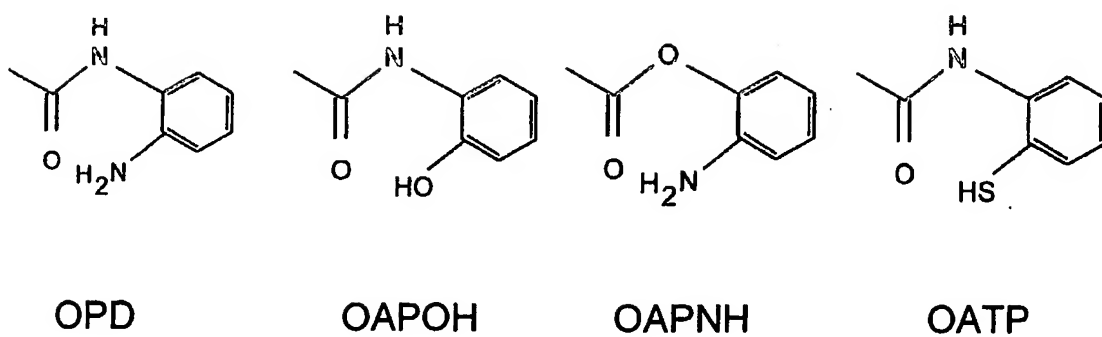
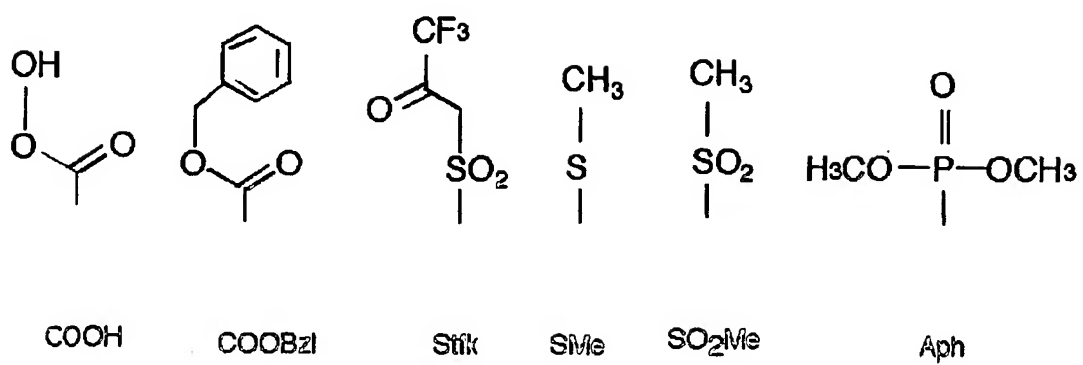
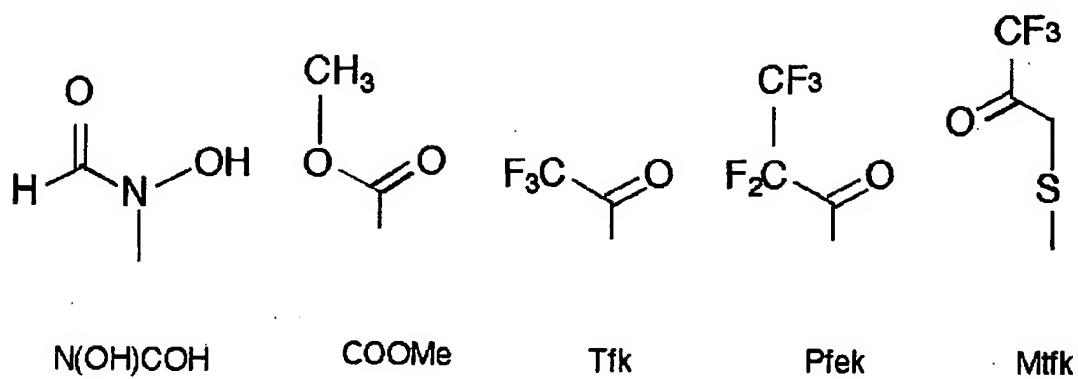
(7) で示される化合物を、触媒的水素化、酸処理、フルオリドアニオン処理、もしくは加水分解により P_1 及び P_2 を除去した後に、ペプチド結合剤の存在下で環化反応するか、または一般式 (1) の環状テトラペプチドの X がカルボキシル基またはスルフィドリル基であるものを、それぞれ無水トリフルオロ酢酸や無水ペンタフルオロプロパン酸または 1, 1, 1-トリフルオロ-3-ブromoアセトンと反応させて別種の置換基 X となすことを含む、請求項 1 記載の化合物の製造方法。

図 1



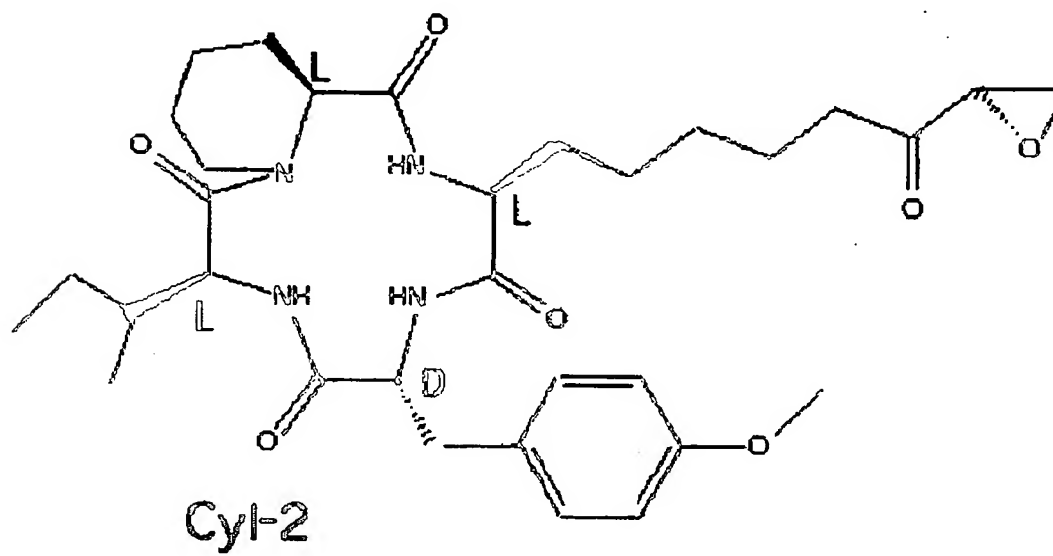
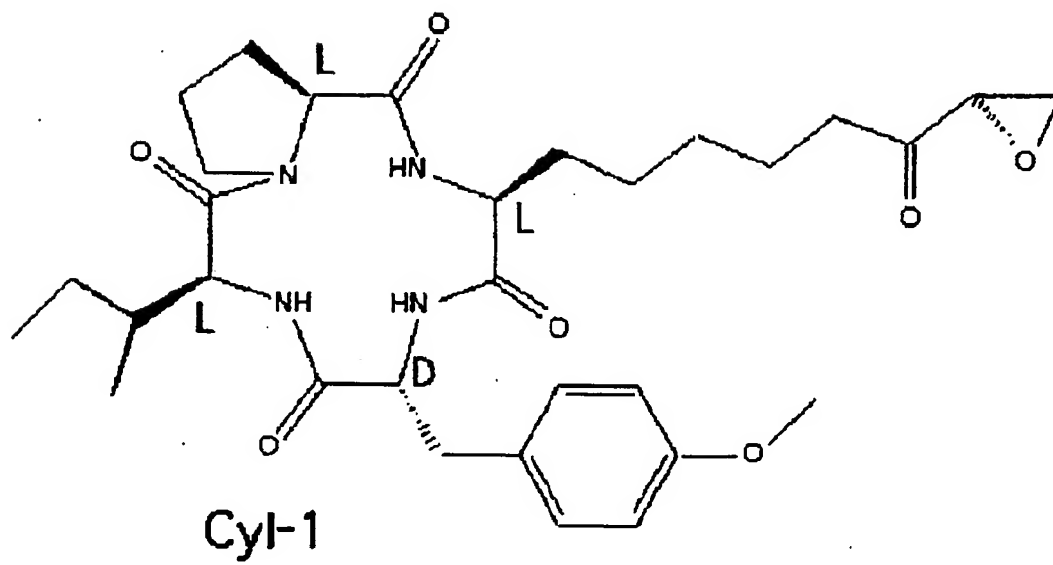
2 / 5

図 2



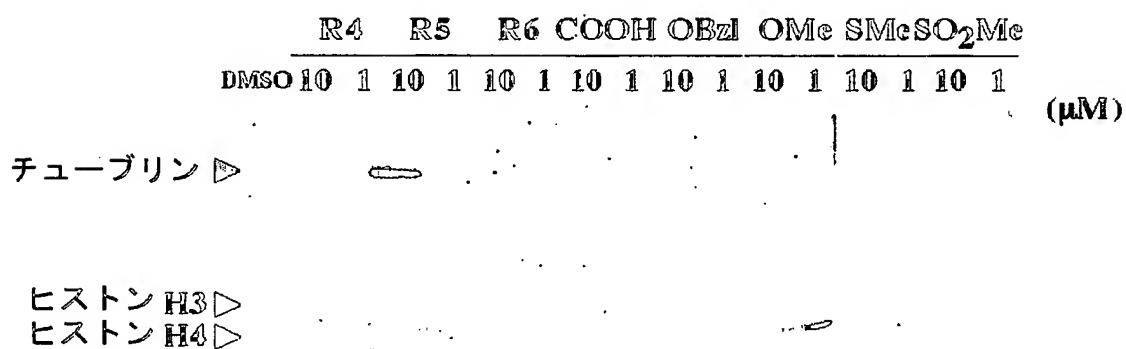
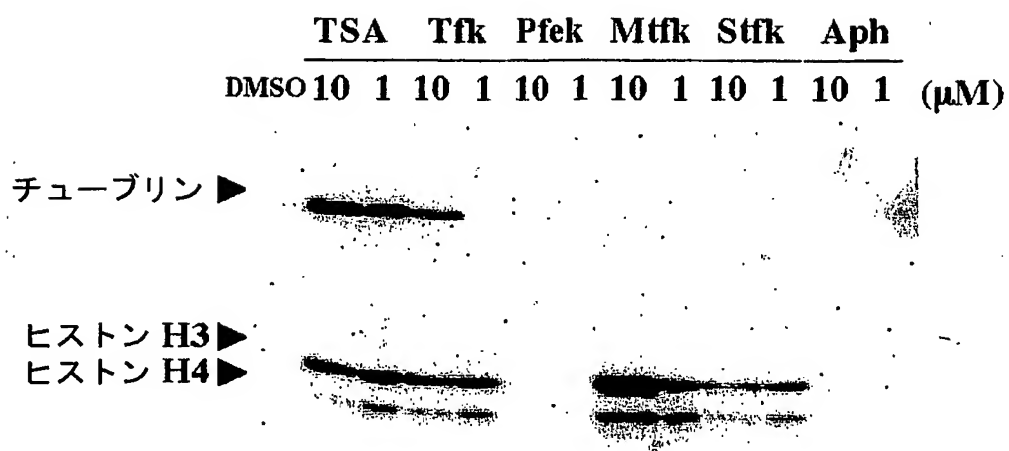
3 / 5

図 3



4/5

図 4

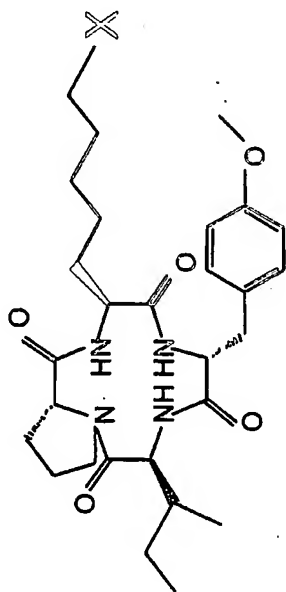
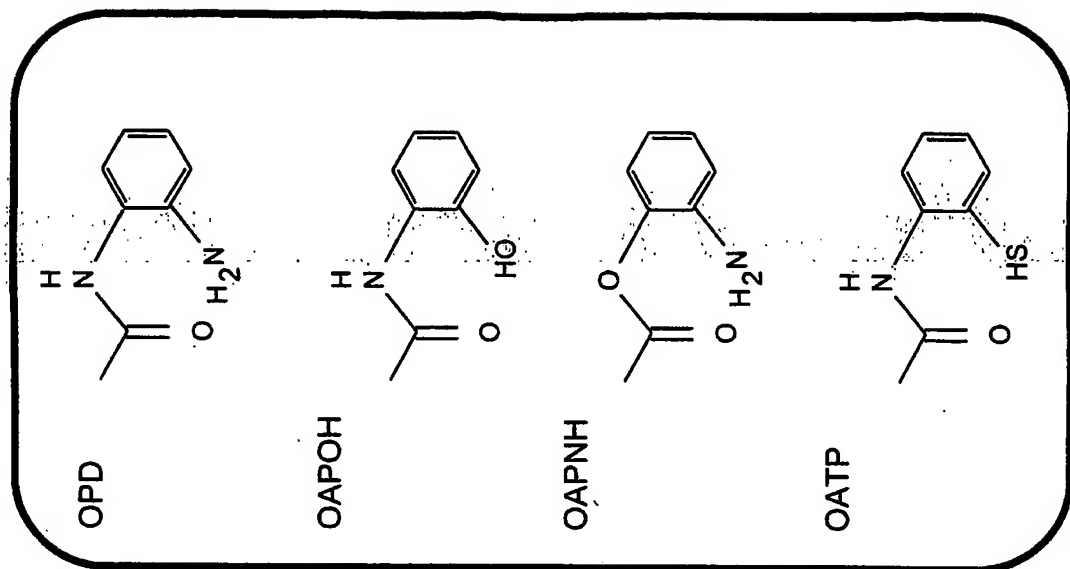


BEST AVAILABLE COPY

5 / 5

図 5

亜鉛配位子(X)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008924

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K5/12, A61P35/00, A61P35/04, C12N9/99, A61P37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K5/12, A61P35/00, A61P35/04, C12N9/99, A61P37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
REGISTRY/CA/MEDLINE (STN), BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| P,X | NISHINO, N. et al., Synthesis and histone deacetylase inhibitory activity of cyclic tetrapeptides containing a retrohydroxamate as zinc ligand., Bioorg Med Chem Lett. (2004 May), Vol.14, No.10, pages 2427 to 2431 | 1-11 |
| P,X | Jose B. et al., Toward an HDAC6 inhibitor: synthesis and conformational analysis of cyclic hexapeptide hydroxamic acid designed from alpha-tubulin sequence., Bioorg Med Chem. (2004 March), Vol.12, No.6, pages 1351 to 1356 | 1-11 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20 July, 2004 (20.07.04)Date of mailing of the international search report
10 August, 2004 (10.08.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008924

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---------------|---|----------------------------------|
| <u>X</u> A | Furumai R. et al., Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin., Proc Natl Acad Sci U S A. (2001), Vol.98, No.1, pages 87 to 92 | <u>1, 3, 9, 10</u> 2, 4-8, 11 |
| A | JP 11-130795 A (Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.), 18 May 1999 (18.05.99), (Family: none) | 1-11 |
| A | WO 01/007042 A1 (MERCK & CO., INC.), 01 February, 2001 (01.02.01), & EP 1204411 A1 & JP 2003-505417 A & US 2003/78369 A1 | 1-11 |
| A | KOMATSU, Y. et al., Cyclic hydroxamic-acid-containing peptide 31, a potent synthetic histone deacetylase inhibitor with antitumor activity., Cancer Res. (2001), Vol.61, No.11, pages 4459 to 4466 | 1-11 |
| A | De Schepper S. et al., Inhibition of histone deacetylases by chlamydocin induces apoptosis and proteasome-mediated degradation of survivin., J Pharmacol Exp Ther. (2003 February), Vol.304, No.2, pages 881 to 888 | 1-11 |
| A | JP 2000-256397 A (Japan Energy Corp.), 19 September, 2000 (19.09.00), & WO 00/52033 A1 & EP 1174438 A1 & US 2002/120099 A1 | 1-11 |
| A | MORI, H. et al., FR235222, a fungal metabolite, is a novel immunosuppressant that inhibits mammalian histone deacetylase (HDAC). I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities., J. Antibiot (Tokyo). (2003 February), Vol.56, No.2, pages 72 to 79 | 1-11 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008924

All the inventions of claims 1-11 are those using a vast plurality of compounds as an effective ingredient. However, only some of the compounds of the formula (1) are supported by the description within the meaning of PCT Article 6 and disclosed therein within the meaning of PCT Article 5.

Therefore, the search has been conducted only on those supported by the description and disclosed therein, namely, those of the Examples.

| | | |
|--|---|------------------|
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) | | |
| Int. Cl ⁷ C07K5/12, A61P35/00, A61P35/04, C12N9/99, A61P37/00 | | |
| B. 調査を行った分野 | | |
| 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) | | |
| Int. Cl ⁷ C07K5/12, A61P35/00, A61P35/04, C12N9/99, A61P37/00 | | |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの | | |
| 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) | | |
| REGISTRY/CA/MEDLINE (STN), BIOSIS/WPI (DIALOG) | | |
| C. 関連すると認められる文献 | | |
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| P X | Nishino N, et. al., Synthesis and histone deacetylase inhibitory activity of cyclic tetrapeptides containing a retrohydroxamate as zinc ligand., Bioorg Med Chem Lett. (2004 May), Vol. 14, No. 10, p. 2427-2431 | 1-11 |
| P X | Jose B, et. al., Toward an HDAC6 inhibitor: synthesis and conformational analysis of cyclic hexapeptide hydroxamic acid designed from alpha-tubulin sequence., Bioorg Med Chem. (2004 Mar), Vol. 12, No. 6, p. 1351-1356 | 1-11 |
| <input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。 | | |
| * 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 | | |
| の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献 | | |
| 国際調査を完了した日 | 国際調査報告の発送日 | |
| 20.07.2004 | 10.08.2004 | |
| 国際調査機関の名称及びあて先 | 特許庁審査官 (権限のある職員) | 4N 9839 |
| 日本国特許庁 (ISA/JP) | 高 美葉子 | |
| 郵便番号100-8915 | 電話番号 03-3581-1101 | 内線 3488 |
| 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | | |

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|---|---------------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| X A | Furumai R, et. al., Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin., Proc Natl Acad Sci U S A. (2001), Vol. 98, No. 1, p. 87-92 | 1, 3, 9, 10 2, 4-8, 11 |
| A | JP 11-130795 A(山之内製薬株式会社)1999. 05. 18 (ファミリーなし) | 1-11 |
| A | WO 01/007042 A1(MERCK & CO INC)2001. 02. 01 & EP 1204411 A1 & JP 2003-505417 A & US 2003/78369 A1 | 1-11 |
| A | Komatsu Y, et. al., Cyclic hydroxamic-acid-containing peptide 31, a potent synthetic histone deacetylase inhibitor with antitumor activity., Cancer Res. (2001), Vol. 61, No. 11, p. 4459-4466 | 1-11 |
| A | De Schepper S, et. al., Inhibition of histone deacetylases by chlamydocin induces apoptosis and proteasome-mediated degradation of survivin., J Pharmacol Exp Ther. (2003 Feb), Vol. 304, No. 2, p. 881-888 | 1-11 |
| A | JP 2000-256397 A(株式会社ジャパンエナジー)2000. 09. 19 & WO 00/52033 A1 & EP 1174438 A1 & US 2002/120099 A1 | 1-11 |
| A | Mori H, et. al., FR235222, a fungal metabolite, is a novel immunosuppressant that inhibits mammalian histone deacetylase (HDAC). I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities., J Antibiot (Tokyo). (2003 Feb), Vol. 56, No. 2, p. 72-79 | 1-11 |

請求の範囲 1-11 に係る発明は、いずれも、非常に広範な化合物を有効成分とする発明である。
しかし、PCT 6 条の意味において明細書に裏付けられ、PCT 5 条の意味において開示されているの
は、式 (1) に包含される化合物のうちのわずかな部分にすぎない。
したがって、調査は明細書に裏付けられ、開示されている部分、すなわち実施例を中心に行った。